

منقلى إقرأ الثقافي
www.iqra.ahlamontada.com

الاستنسال البايولوجي

الطريق الطويلة نحو دولي

والإستساخ البشري



الدكتور

إبراهيم محمد علي فاضل العبيدي



لتحميل أنواع الكتب راجع: (مُنْتَدَى إِقْرَأِ الثَّقَافِي)

پراي دانلود کتابهای مختلف مراجعه: (منتدی اقرا الثقافی)

پۆدابهزانانی چۆرهها کتیب: سەردانی: (مُنْتَدَى إِقْرَأِ الثَّقَافِي)

www.iqra.ahlamontada.com



www.iqra.ahlamontada.com

للكتيب (كوردی , عربي , فارسي)

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الإستسّال البايُولُوجِي

الطريق الطويلة نحو دولي

والإستسّاخ البشري

رقم التصنيف : 575.12
المؤلف ومن هو في حكمه : اياد محمد علي العبيدي
عنوان الكتاب : الاستسـال البايولوجي : الطريق
الطويلة نحو دوللي أو الاستساخ البشري
رقم الإيداع : (2001/1/50)
الموضوع الرئيسي : الاستساخ البشري
بيانات النشر : عمان-دار المسيرة للنشر والتوزيع
* - تم اعداد بيانات الفهرسة الأولية من قبل دائرة المكتبة الوطنية

حقوق الطبع محفوظة للنـاشـر

جميع حقوق الملكية الأدبية والفنية محفوظة لدار المسيرة للنشر والتوزيع
- عمان - الأردن ويحظر طبع أو تصوير أو ترجمة أو إعادة تنضيد
الكتاب كاملاً أو مجزأ أو تسجيله على أشرطة كاسيت أو إدخاله على
الكمبيوتر أو برمجته على اسطوانات ضوئية إلا بموافقة الناشر خطياً.

Copyright ©

All rights reserved

الطبعة الأولى

1421هـ - 2001م



دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة

عمان - ساحة الجامع الحسيني - سوق البزء - هاتف 4640950 فاكس 4617640
ص.ب 7218 عمان 11118 الاردن

DAR AL-MASSIRA Publishing - Distributing - Printing

Tel: 4640950 Fax: 4617640

P.O.Box: 7218 Amman - 11118 - Jordan

<http://www.daralmassira.com>

E-mail : info@daralmassira.com

E-mail : sales@daralmassira.com

ISBN 9957 - 06 - 106 - 2 (ردمك)

الإستنبال البايولوجي

الطريق الطويلة نحو دولي

والإستنبال البشري

الدكتور

إبراهيم محمد علي فاضل العبيدي

الطبعة الأولى

1421 هـ - 2001 م



دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة

محتويات الكتاب

الموضوع	الصفحة
المقدمة	7
الفصل الأول: الاستئصال البايولوجي ... الأوهام والحقائق	9
الفصل الثاني: التطور التاريخي لتقنيات التحوير الجيني	
والاستئصال البايولوجي	29
الفصل الثالث: التقنيات التحضيرية في التطويع المجهري	
والاندماج الكهربائي	39
الفصل الرابع: هندسة التكاثر وآفاق التحوير الجيني	59
الفصل الخامس: الاستئصال البايولوجي ... المحاولات الأولى	91
الفصل السادس: النقل النووي	113
الفصل السابع: الاستئصال البشري ... النواحي الأخلاقية	
والدينية والفلسفية	139
المصادر العربية	173
المصادر الانكليزية	178
قراءات إضافية مقترحة	187

الإهداء

إلى . . .

أطفال الحصار . . .

ضحايا الجوع والنار والدمار

إلى . . .

من حفر الدمع في وجنتيه السواقي

والأرض تصرخ وتبكي.

ففي هذه البقعة . . .

ترقد جثة طفل عراقي

قتله الحصار

قتله الجوع

قتله الدمار . . .

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

المقدمة

بسم الله والصلاة والسلام على رسول الله (محمد بن عبد الله) خاتم الأنبياء والمرسلين وعلى آله وصحبه الكرام الميامين أجمعين.

في خضم الأحداث العظام والحوادث الجلل والتقدم العلمي غير المسبوق الذي شغل مساحات واسعة من تطلعات وآفاق القرن العشرين، فإن لكل حقبة زمنية مميزاتها الخاصة التي تنفرد بها عن غيرها، حيث شهد الربع الأخير من القرن المنصرم بروز تقنيات الهندسة الوراثية والتي رافقت التطورات الكبيرة الأخرى في مجالات علوم الحياة وعلم الأجنة والتي مهدت الطريق نحو إنتاج حيوانات ونباتات وأحياء مجهرية محورة وراثياً* وتمتلك صفات جديدة لم تكن تمتلكها بالأصل، وكان هذا الاختراق لحاجز النوع انطلاقة كبيرة لمجال جديد من التقنيات المتقدمة تعرف الآن باسم تقنيات هندسة التكاثر، وبعيداً عن إرهابات الجهل والتقييم غير الموضوعي لحدث اكتسب أبعاداً إعلامية وربما بدرجة أكثر مما ينبغي، فإن استئصال النعجة «دوللي» كان طفرة نوعية متقدمة في مجال تقنيات هندسة التكاثر نظراً لأنها اخترقت تابو المحرمات للمرة الثانية منذ المرة الأولى التي تمت على يد «فيساليوس» في عام 1543م، حين بدأ عصر تشريح الجسد الإنساني يصبح مقبولاً.

إن المخاوف المتزايدة من إمكانية استخدام تقنيات الهندسة الوراثية والاستئصال البايولوجي في هندسة الإنسان وراثياً لها في الواقع أساس قوي من خلال توفر نواقل الاستئصال العملاقة مثل كروموسوم الخميرة الصناعي (YAC) والكروموسوم البشري الصناعي (HAC) القادر على نقل حمولة جينية تقارب (3000) جين دفعة واحدة.

ويمكن أن يفسر تلاعب الإنسان بالنظام المتوازن للحياة عن عواقب وخيمة، حيث يمكن لإنسان ما يمتلك مزيجاً من النرجسية وحب الذات وجنون العظمة أن يستئصل ذرية من النسائل المتماثلة التي تؤدي إلى اختلاط اجتماعي مربك وفي غاية التعقيد ولكن كل

هذه المخاوف قد تزول أمام مفهوم الاستئصال العلاجي الجديد والعلاج الجيني، يتضمن الكتاب ثماني فصول باستثناء المقدمة والمصادر ويتضمن الفصل الأول حقائق عن الاستئصال البايولوجي وأوهامه، يتبعه في الفصل الثاني نبذة عن التطور التاريخي لتقنيات هندسة التكاثر منذ القرن التاسع عشر وإلى بدايات القرن الحادي والعشرين، أما التقنيات التحضيرية للتطويع المجهرى والاندماج الكهربائي والتقنيات المختلفة لخطر وتنصيف الأجنة فتشكل محتوى الفصل الثالث وسوف نتناول في الفصل الرابع هندسة التحوير الجيني وآفاقها وإنتاج البروتينات العلاجية باستخدام الحيوانات المحورة جينياً كمفاعلات حيوية. أما المحاولات الأولى للاستئصال البايولوجي ابتداء من استئصال الضفادع إلى القروء فقد تم التطرق إليها الفصل الخامس وشمل الفصل السادس شرحاً مسهباً وتحليلاً لتقنية النقل النووي وهي التقنية التي استخدمت في استئصال النعجة «دوللي» والتي سوف يتم التطرق إليها بإسهاب في الفصل السابع وبعنوان الطريق إلى «دوللي»، أما النواحي الأخلاقية والدينية والفلسفية للاستئصال البشري فكانت مادة الفصل الثامن.

ونلتمس من القارئ الكريم المعذرة عن أي هفوة غير مقصودة (والكمال لله وحده) وأدعو بإخلاص كافة الأساتذة والزملاء لتقديم ملاحظاتهم القيمة عن الكتاب. ويحدوني الأمل في أن يشكل هذا الكتاب إضافة نوعية إلى المكتبة العربية في مجال متطور من مجالات العلوم المتقدمة.

والله من وراء القصد.

الدكتور

أباد محمد علي فاضل العبيدي

الفصل الأول

الاستنسال البايولوجي

الأوهام والحقائق

1 - 1 مقدمة عامة

في برهة قصيرة من الزمن حقق العلماء انجازات بالغة الدقة والروعة كانت وإلى وقت قصير تعد من المستحيل الذي لا يمكن أن يتحقق إلا بمعجزة أو سلسلة من المعجزات، ولكنها وبرغم دقتها وروعته لا تضاهي قدرة الخالق العظيم في خلقه وإبداعه الذي لا يضاهيه شيء في الكون ﴿يا أيها الناس اتقوا ربكم الذي خلقكم من نفس واحدة وخلق منها زوجها وبث منهما رجالاً كثيراً ونساء واتقوا الله الذي تساءلون به والأرحام﴾ (سورة النساء/ آية 1).

والإنسان هو معجزة هذه الحياة، إذ يقول الفيلسوف (سوفوكليس): «كثيرة هي المعجزات في الدنيا ولكن الإنسان أعظمها».

يتكون الإنسان (المعجزة) من 75 - 100 تريليون خلية، ويبلغ الطول الكلي للشرايين الدموية في جسم الإنسان حوالي 100.000 كيلومتراً وكل خلية حمراء تحتوي على 270 مليون جزيئة هيموكلوبين، ويضخ قلب الإنسان البالغ 10.000 لتراً من الدم يومياً ويستوعب الدماغ خلال حياة الإنسان (متوسط العمر) حوالي عشرة كوادريون وحدة من المعلومات، ويضم الجهاز العصبي حوالي 10 مليارات خلية عصبية، ويحتوي جلد الإنسان على 250 ألف مقياس للبرد و 30 ألف مقياس للحرارة ومليون لقياس درجة الألم، ونصف مليون لحاسة اللمس، ويحتوي اللسان على 9000 مقياس للتذوق.

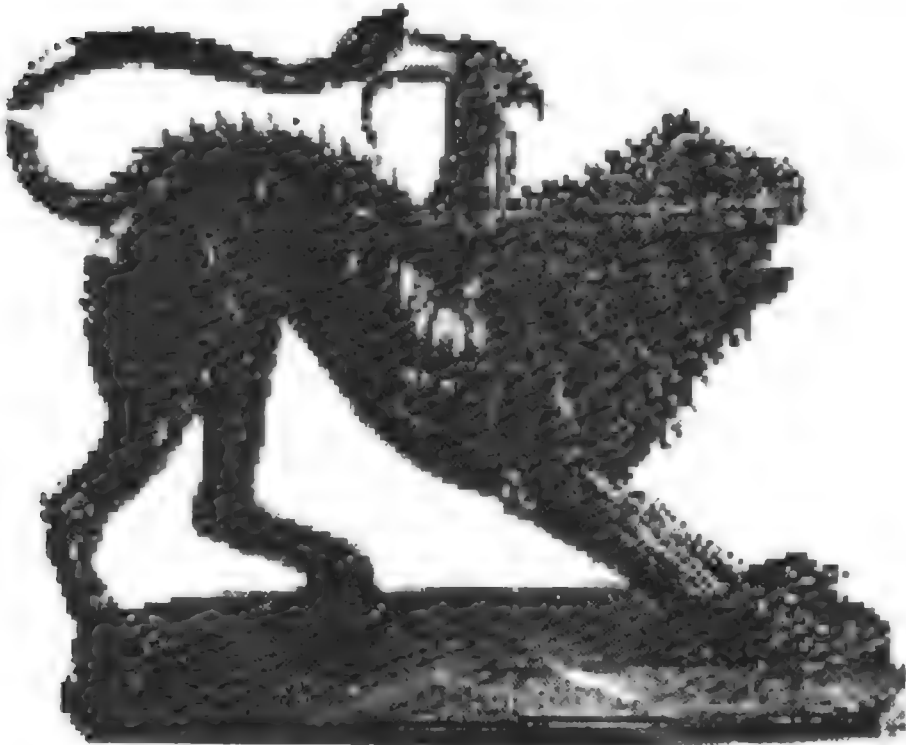
أما الأذن الداخلية فتضم حوالي 25000 خلية تتأثر بالأصوات وتلتقط ذبذبات تتراوح بين 16 - 2000 هيرتز، ويستطيع الإنسان إدراك الصوت خلال 35 - 175 ملي ثانية بعد وصوله للأذن وهذه الحقائق المدهشة تظهر عظمة الخالق وإبداعه.

وكانت الحكمة الإلهية في خلق الأنواع واضحة وماثلة في تمايزها وتباينها عن بعضها ووجود ذلك الحاجز (حاجز الأنواع) الفاصل بينها، حيث كان حلم الإنسان ومنذ

فجر الحضارات أن يخترق حاجز النوع ويصل إلى أقصى حدود القوة والكمال والذي تمثل بحيوان الكايميرا الخرافي (الشكل 1 - 1) في الأساطير الإغريقية.

وتشير الأسطورة الإغريقية المشهورة أيضاً إلى وحش مخيف يعرف باسم (مينوتور) نصفه إنسان ونصفه الآخر بهيئة ثور يعيش في جزيرة كريت.

وكان طعام هذا الوحش المخيف مقصوراً على لحم البشر، وكان سكان الجزيرة يقدمون له سبعة من الفتيات الجميلات كل عام يضجون بهن في سبيل تركهن يعيشون في الجزيرة بسلام واستمروا في تقديم الأضاح والقرايين سنوياً حتى قيام المعركة الكبرى بين البطل (ثيسوس) والوحش والتي قضى فيها هذا البطل نهائياً على الوحش الأسطوري.



الشكل (1 - 1) : حيوان الكايميرا Chimaera الخرافي بجسم الأسد ورأس الماعز وذيل الأفعى والذي يبصق النار من فمه، هو جزء من الأساطير الإغريقية.

وشملت الأساطير حضارات أخرى فتضمنت الحضارة الفرعونية الرمز الأسطوري (أبا الهول) وهو تمثال برأس إنسان وجسم أسد، وحضارات وادي الرافدين الأكثر تقدماً (أسطورة ملحمة كلكامش وتمثال الثور المجنح)، وفي حضارات الشرق الأقصى في الصين واليابان والتمثلة بحيوان التنين المجنح الحارق الأسطوري.

وكل هذه الخرافات والأساطير التي نسجها الإنسان القديم كانت تعبيراً عن توفقه للمعرفة والكمال وعجزه في الوقت ذاته عن تقديم التفسير الصحيح لغموض أسرار الخلق والنشوء والتطور.

ولا تزال رغبة الإنسان في التدخل في السيرورات الطبيعية متأججة فهو يحاول دائماً أن يساهم في إيجاد واستيلاد أنواع جديدة من الحياة وإن لم يكن مبدعها، فتمكن من إنتاج حيوان الراما (الشكل 1 - 2) والذي أنتج كهجين من تزاوج حيوان الجمل العربي بحيوان اللاما الذي يعيش في جبال أمريكا الجنوبية.

وعلى الرغم من أهمية الوراثة التقليدية وطرق التهجين التقليدية في تحسين النوع والحصول على صفات مرغوبة يمكنها التوارث بثبات فإن انبثاق عهد جديد من تقنيات الهندسة الوراثية والتي بدأت خطواتها الأولى في عام 1971، حين اكتشفت مجموعة من الأنزيمات لها القدرة على قطع أشربة الدنا ونقلها باستخدام نواقل خاصة من نوع لآخر مخترقاً حاجز النوع وممتلكاً القدرة على انتخاب ما يشاء ويرغب من الصفات المرغوبة لنقلها إلى الأنواع المهندس وراثياً والتي يمكنها اكتساب الجينات المنقولة وإدغامها بنجاح في موروث كينونتها وإنتاج البروتينات الإضافية التي تشفر لها الجينات المنقولة، حيث تتوارث الصفات المكتسبة بثبات.

إن القدرة اللامتناهية على التلاعب الوراثي تجعل الإنسان النوع الحي الوحيد الذي يمكنه التدخل في سيرورات النشوء والتطور بغض النظر عما يثيره ذلك من اعتراضات أخلاقية أو دينية. ولم يكن استئصال النعجة «دوللي» سوى الخطوة الأولى والأكثر واقعية نحو سيرورة التطور الموجه.



راما ابن الجمل واللاما

الشكل (1-2) : يمكن إنتاج هجائن من الأنواع الحيوانية المتقاربة وغالباً ما تمتاز هذه الهجائن بقوة التحمل ولكنها قد تكون عقيمة، في الشكل تمكن الخبراء في دولة الإمارات العربية المتحدة من الحصول على هجين من تزاوج الجمل واللاما سمي «راما».

وأثارت قدرة الهندسة الوراثية الخيال نحو المزيد من الأفكار الأكثر تطرفاً، ومنها إعادة الحياة للكائنات الحية المنقرضة، إذ أشار عالمان اكتشفا ذبابتين محفوظتين في (حجر الكهرمان) مع عناصرهما الخلوية الكاملة يعود عمرهما إلى 95 مليون سنة مضت إلى إمكانية تطبيق التقنيات المتقدمة في استخلاص الدنا والصيغيات الوراثية فيهما لاستنسال ذبابة جديدة ولكن بعمر وراثي يبلغ ملايين السنين.

إن إيقاظ الحياة الغافية منذ الأزل (جزئيات الدنا هي جزئيات كيميائية بحتة «إن صح التعبير» فإذا ما تمت المحافظة عليها من الأكسدة والتميؤ فإنه يمكن استعادة قدرتها على التعبير بوجود منظومات وأنزيمات التضاعف والاستنساخ والترجمة) وللملايين عدة من

السنين، قد يكون حتماً قابلاً للتحقيق جزءاً أم كلاً، من خلال الاكتشافات الحديثة للأحافير والمستحاثات، حيث عثر العالم «سوهند ريكسون» على ديناصور متحجر من نوع (تريناصورديكس) أكل اللحوم، ويقدر عمره بـ 25 مليون سنة في صحراء داكوتا الجنوبية ويعتبر أكبر وأكمل ما عثر عليه لحد الآن، كذلك تم العثور على مجموعة من بيض الديناصور في مقاطعة «هيتان» الصينية، ويقدر عمر هذا البيض بين 65 - 125 مليون سنة، وعندما تم فحصها بأشعة الليزر بينت إحداها احتوائها على جنين ديناصور هو الأول من نوعه وربما يكون أهم اكتشاف في القرن العشرين المنصرم، وأطلق على الجنين اسم نيكول (Necole) .

واكتشفت عالمة كندية أخرى في مقاطعة «البرتا الغربية» 10 بيوض للديناصور تعود إلى أكثر من 70 مليون عام وإنها قد تعود إلى نوعين غير مكتشفين لحد الآن من حيوان الديناصور .

وفي صقيع سيبيريا في روسيا اكتشف المئات من حيوانات الماموث المنقرضة وهي الأجداد أو السلف الأول للفيلة الحالية، مطمورة ومدفونة تحت الجليد، وإن نقل بعض الجينات أو المادة الوراثية لخلايا الماموث وإيلاجها في موروث الحيوانات الضخمة الموجودة حالياً كالفيلة، بل وربما يمكن تصنيع أي تعاقب من الدنا القديم باستخدام جهاز يعرف بمخلق الدنا DNA Synthesizer ، حيث اكتسبت الدراسات حول الدنا القديم قدراً كبيراً من الواقعية من خلال الدراسات التي أجراها العالم «سفانتي بابو» Svante Paabo الذي أجرى دراسات مكثفة على هيكل عظمي لإنسان نياندرتال وبينت نتائج دراسته أن إنسان نياندرتال ليس هو السلف الأصلي للإنسان العاقل الحالي .

وأجرى هذا الباحث أيضاً دراسة على 23 مومياء مصرية ونجح في تحديد تسلسل القواعد التروجينية في حوالي 5% من الدنا العائد لهذه المومياءات. فهل نتوقع يوماً أن يحمل أطفال اليوم بعضاً من جينات أسلافهم من الفراعنة، وهناك أفكار أكثر تطرفاً فهل يمكن باستخدام تقنية الاستنسال أن تمزج نواة سليمة المحتوى الكيميائي (رغم كونها غير حية) لأحد المومياءات في بويضة امرأة من عصرنا الحاضر للحصول على طفل هو نسخة طبق الأصل من فرعون مصري توفي قبل 4000 عام .

إن التطور المذهل في تقنيات وأساليب الحقن المجهرية (الشكل 1 - 3) أدى إلى تقدم كبير في القدرة على التطويع المجهرية للبيوض والإخصاب الخارجي، وإلى تطور كبير في تقنيات الاستئصال مع التطور العلمي الكبير في حلقات أخرى من هندسة التكاثر، مثل تطوير جهاز للرحم الاصطناعي (الشكل 1 - 4) سيؤدي إلى زيادة قدرة الإنسان في التحكم بعمليات التطويع والاستهداف الجيني والاستئصال، وقد يؤدي الدمج بين تقنيات التحوير الجيني والهندسة الوراثية وتقنية الاستئصال إلى امتلاك الإنسان لصفات كانت حكراً على الحيوانات (الشكل 1 - 5) فهل يعد هذا التطويع الجيني تحسناً للنوع البشري أم انحداراً رهيباً نحو العشوائية البيولوجية، يقول سبحانه وتعالى في محكم كتابه العزيز:

﴿ لقد خلقنا الإنسان في أحسن تقويم ﴾ (سورة التين/ آية 4) .



الشكل (1 - 3) : أدى تطور تقنيات الحقن المجهرية إلى حدوث تقدم كبير في تقنية الاستئصال البيولوجي .



نعجة يابانية من رحم اصطناعي

شكل (1-4) : جهاز الرحم الاصطناعي . . . نجح العلماء اليابانيون في استيلاد نعجة من رحم اصطناعي .



الشكل (1-5) : هل يمكن باستخدام تقنيات الهندسة الوراثية للإنسان أن يكتسب نعومة القطة وشراسة الذئب وخفة الخلد ودهاء الثعلب وذكاء القندس .

1 - 2 المادة الوراثية ... الدنا DNA وأسرار الجينات

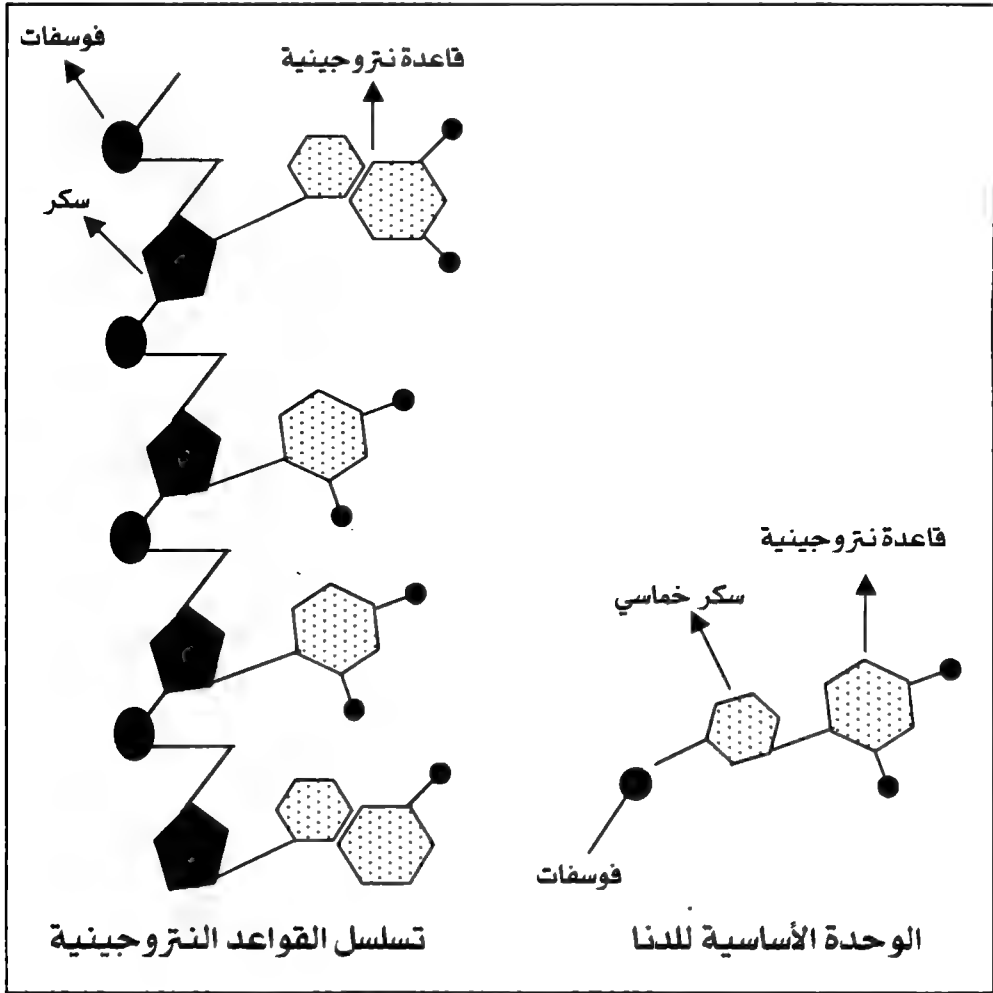
أدرك الإنسان أهمية الوراثة منذ أكثر من عشرة آلاف عام من سجل الحضارة والتاريخ البشري المدون، وربما كانت التطبيقات الزراعية ومحاولة الفلاح البدائي انتخاب أفضل الحبوب من أجل الإنتاج الغزير، وربما كان القربان الذي قدمه كل من قابيل وهابيل هو الدليل الأول على أول عملية انتخاب في التاريخ. فقدم الأول أسوأ ما لديه من شعير في حين اختار الثاني أفضل ما لديه من الخراف قرباناً إلى الله (سبحانه وتعالى) الذي تقبل من هابيل ولم يتقبل من قابيل... إلى آخر القصة المعروفة.

وكان الفراعنة يضعون أفضل الثمار والحبوب مع المومياءات في القبور، ولكن المعرفة العلمية بأسس انتقال الصفات المرغوبة من جيل إلى جيل ربما كان يسودها الشيء الكثير من الغموض إلى أن حدث التطور الأكثر أهمية في علم الوراثة حينما توصل «كريكور مندل» إلى قوانينه المعروفة في أواسط القرن التاسع عشر، حيث اكتشف العوامل المسؤولة عن انتقال الصفات الوراثية (الجينات) وبسبب جمود الفكر الإنساني وعدم استجابته للتغير السريع في المفاهيم آنذاك، تم إهمال النتائج الرائعة التي توصل إليها العالم «مندل» إلى أواخر القرن المذكور، حيث أدى التطور المتسارع في تقنيات علم الوراثة إلى إعادة اكتشاف ما توصل إليه «مندل».

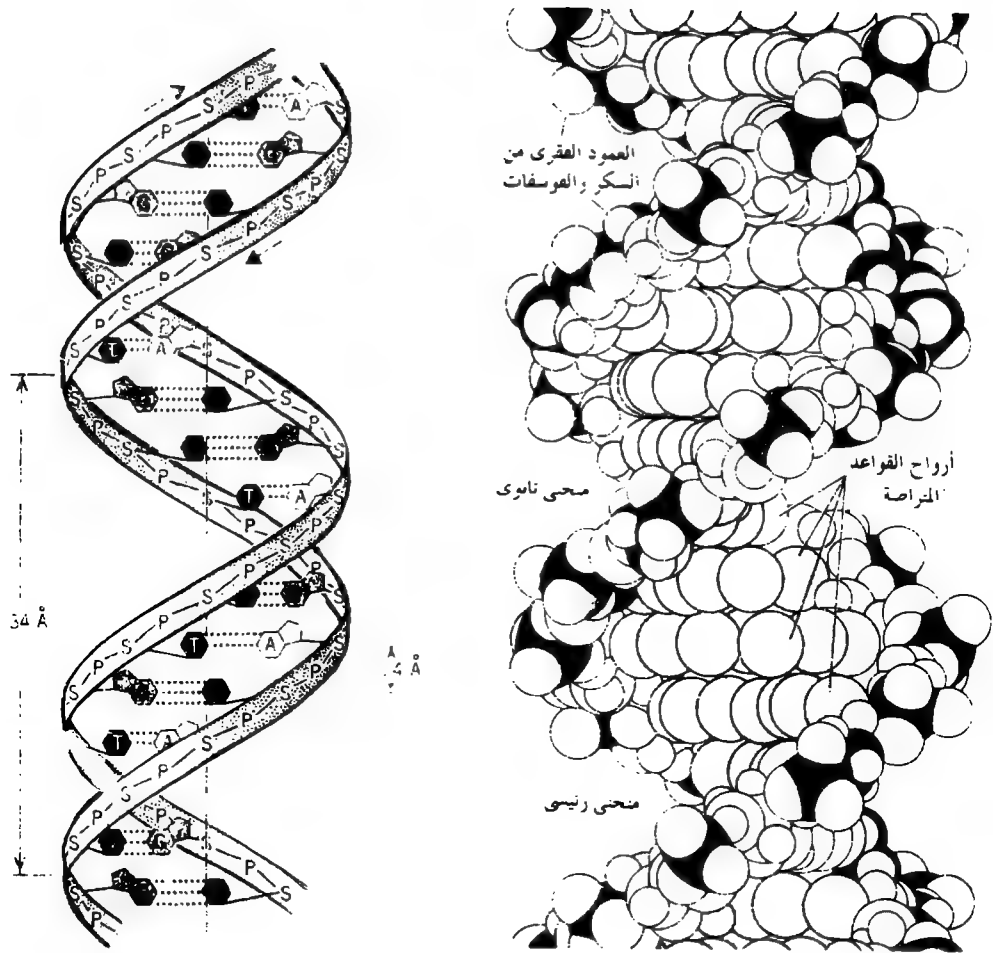
وفي عام 1868 اكتشف العالم «فريدريك ميسر» أن الكروموسومات تتكون بصورة رئيسية من البروتينات والأحماض النووية، وفي عام 1889 تمكن العالم «آلتمان» من فصل الأحماض النووية عن البروتين، وتمكن العالمان «بيدل وتاتوم» في عام 1940 من التوصل إلى فرضية جين واحد للأنزيم الواحد one gene - one enzyme أي أن كل جين يكون مسؤولاً عن التشفير لإنتاج أنزيم واحد.

وفي عام 1953 حدث الاكتشاف الأكثر أهمية في تاريخ الكيمياء الحياتية والأحياء الجزيئي، إذ توصل كا من واتسون وكريك إلى نموذج التركيب ثلاثي الأبعاد للحامض النووي وكانت تلك هي خطوة البداية نحو علم الأحياء الجزيئي الحديث.

يشكل السكر الخماسي منقوص الأوكسجين والفوسفات العمود الفقري لسلسلة -- ويشكلان مع القاعدة النتروجينية وحدة بناء مادة الدنا وهي النيوكليوتايد، ويرتبط النيوكليوتايد في سلسلة الدنا مع الآخر بأواصر فوسفاتية ثنائية الأستر (الشكل 1 - 6) يرتبط كلا السلسلتين في خيط الحلزون المزدوج ببعضهما من خلال الأواصر هيدروجينية بين القواعد النتروجينية (الشكل 1 - 7) وهي ثلاثية بين السيتوسين ونيكوانين وثنائية بين الأدينين والثايمين.



الشكل (1 - 6): الوحدات الأساسية للحامض النووي وتسلسل القواعد النتروجينية وارتباطهما مع الفوسفات والسكر الخماسي.



الشكل (1 - 7) : تركيب الدنا ويوضح الحلزون المزدوج المكون من شريطين متتامين متكاملين ويرتبطان من خلال الأواصر الهيدروجينية التي تربط بين القواعد التزوجينية فيهما.

1 - 2 - 1 أين تقع الجينات

تختلف أعداد الكروموسومات باختلاف الكائنات الحية وتتراوح بين اثنين إلى عدة مئات، فعددها في الحصان 66 والأغنام 54 وذبابة الفاكهة 8 والفأر المنزلي 40 والفراسة الإسبانية 380 والخلية الجسدية للإنسان تحتوي على 46 كروموسوم.

ويحتوي كل كروموسوم في الخلايا حقيقية النواة على جزيئة دنا DNA مزدوجة

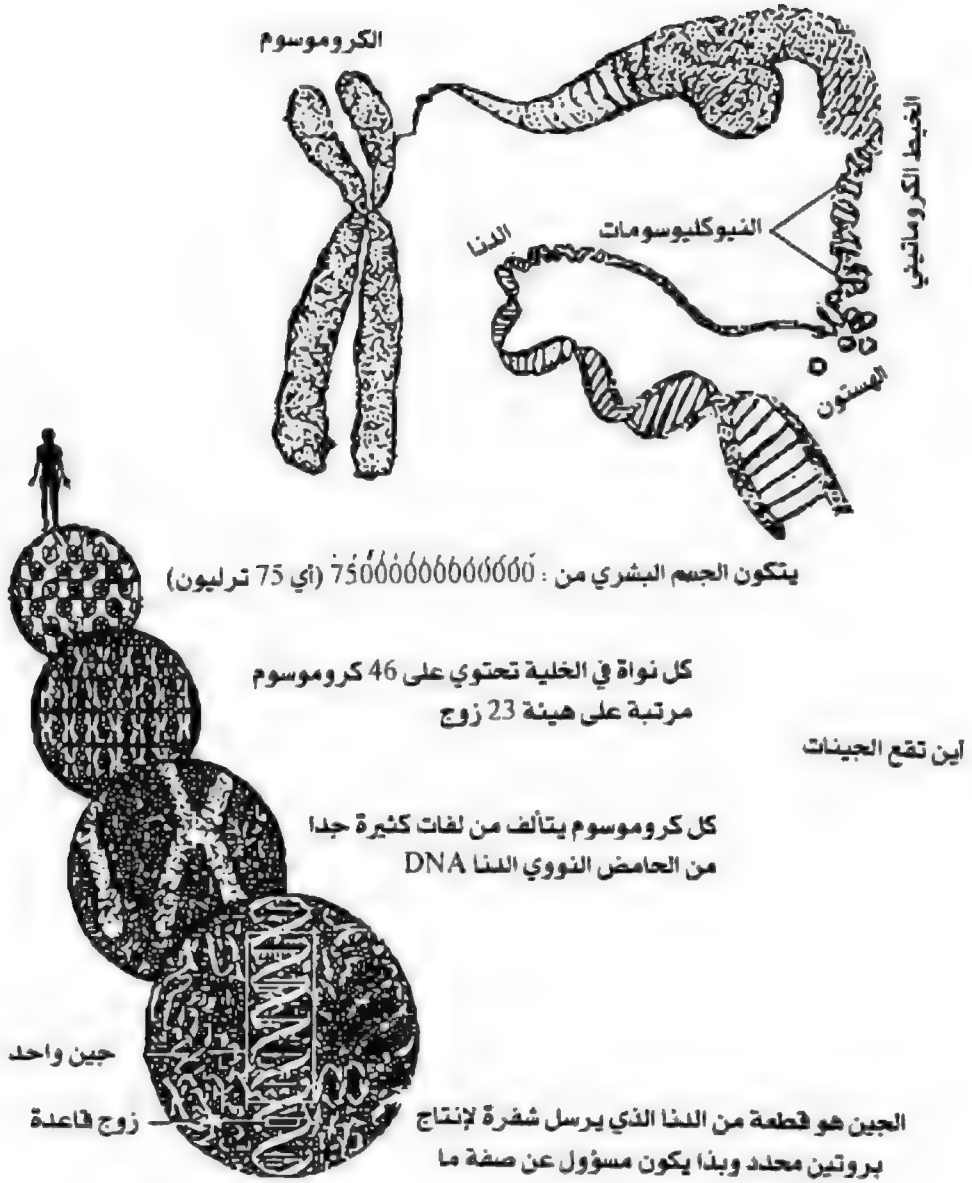
كبيرة (الشكل 1 - 8) وتكون جزيئة الدنا في الخلايا حقيقية النواة مستقيمة وغير دائرية، ويحمل كل كروموسوم طاقم من الجينات (حاملات الصبغة الوراثية) الخاصة به وتشكل جينات بأجمعها الموروث genome .

وتسمى الكروموسومات (الصبغيات) في حالة الخلايا غير المنقسمة بالكروماتين Chromatin وتكون غير منتظمة وعشوائية الانتشار خلال جميع أجزاء النواة، ويتكاثف ككروماتين حال تهيأ الخلية للانقسام ويتنظم في أعداد من الكروموسومات متخصصة لكل نوع.

ويوجد الدنا في الكروماتين متحد بشدة مع بروتينات تسمى بالهستونات Histones تكون وظيفتها رزم وتنظيم الدنا في وحدات تركيبية تسمى بالنوكليوسوم Nucleosome . يشكل الجين قطعة من الدنا تحوي على سلسلة من الشفرات تشفر لببتيد واحد أو جزيئة رنا RNA والمفهوم الجزيئي للجين يتمثل بكونه ذلك الجزء أو تلك القطعة من الكروموسوم التي تعين أو تشفر لأنزيم واحد (رغم أن بعض الجينات تشفر لبروتين غير أنزيمي) يحتوي الموروث البشري على جينات عددها بحدود 90 ألف - 120 ألف جين . ويهدف مشروع تحديد الذخيرة الوراثية البشرية إلى تحديد مواقعها ووظائفها جميعاً.

1 - 3 مفهوم الاستنسال (الاستنساخ):

كان الإعلان عن استنسال النعجة «دوللي» في عام 1997 وقع الصدمة، فهي أول حيوان من الثدييات يتم استنساله من خلية جسمية متخصصة ومتمايزة وسرعان ما تداول الناس مصطلح الكلونة (Cloning) على أنه من المصطلحات اللغوية الجديدة، ولم يكن هذا في الواقع على شيء من الصحة، إذ استخدم علماء الوراثة والنبات منذ عشرات السنين هذا المصطلح، فماذا تعني مصطلحات: الكلون Clone والكلونة Cloning و مصطلح (Asexual clonal Reproduction) .



الشكل (1 - 8) : تركيب الكروموسومات في الخلايا الحقيقية النواة (الشكل الأعلى) وموقع الجينات في الإنسان (الشكل الأسفل).

يعود أصل كلمة (Clone) أو (Klon) إلى اللغة اليونانية وتعني البرعم الوليد أو الغصين. ويستعمل بعض العلماء مرادف النسيلة أو السلسلة، فالنسل في اللغة

عربية هو الخلق، والنسل: الولد أو الذرية، والجمع أنسال (وتناسلوا أي ولد بعضهم بعضاً)، وفي القرآن الكريم: ﴿فإذا هم من الأجداث إلى ربهم ينسلون﴾ (سورة يس/ الآية 51).

ويمكن تعريف النسيلة (Clone) بأنها مجموعة من الخلايا أو الأفراد المتماثلة وراثياً والناتجة من خلية واحدة أو من فرد واحد عن طريق الانقسام الخلوي المايوتوزي، فالمستعمرة البكتيرية الناتجة من خلية بكتيريا واحدة مزروعة في طبق بتري هي نسل أو كلونات.

أما مصطلح الكلونة Cloning فيأتي بمعنىين، الأول هو التنسيل أو الاستنسال وهو عملية إنتاج أفراد متماثلة وراثياً من أحد الأبوين، ويطلق البعض على هذا المعنى مرادف «الاستنساخ» والاستنساخ في اللغة العربية يعنى كتب كتاب من كتاب، ويقال نسخ الشيء ينسخه نسخاً وانتسخه واستنسخه، وفي كتاب الله العزيز: ﴿إنا كنا نستنسخ ما كنتم تعملون﴾ (سورة الجاثية/ الآية 29).

ويرد النسخ أيضاً بمعنى تبديل الشيء من الشيء أو بمعنى الإزالة، ويقابل كلمة الاستنساخ باللغة الإنكليزية كلمة (Transcription) والتي تطلق على عملية استنساخ الدنا DNA إلى رنا مرسال m - RNA وتكوين نسخ Copying منه.

أما المعنى الثاني للاستنسال فهو عملية استنسال الجينات وأكثارها باستخدام تقنيات الهندسة الوراثية، وكما سيرد ذكره لاحقاً، أما مصطلح Asexual Clonal Reproduction ويعني التكاثر الاجنسي النسييلي فربما يعد الأكثر قرباً من معنى التقنية المستخدمة في استنسال «دولي»، حيث يمكن تعريفه بأنه عملية إنتاج توائم أو مجاميع من التوائم عن طريق صيغة من صيغ التكاثر اللاجنسي، أو هو تكوين كائن كامل من خلية واحدة عن طريق غير طريق التكاثر الجنسي المعتاد، وبالرغم من أن مصطلح التكاثر اللاجنسي النسييلي هو الأكثر دلالة على مفهوم مصطلح الكلونة Cloning فإن عدم شيوعه يجعلنا نستخدم مصطلح الاستنسال للدلالة على هذه التقنية.

وتتوفر في الوقت الحاضر ثلاثة أنواع من هذه التقنية:

1 - الاستئصال الجيني Gene cloning :

تعد هذه التقنية جزءاً من تقنيات الهندسة الوراثية وتعرف أيضاً بتقنية التأسيس الوراثي للدنا (Recombinant DNA Technology) وقد ظهرت للوجود لأول مرة في عام 1973، حين توصل كل من «هيربرت بوير» و «ستانلي كوهين» إلى أول استراتيجية لتقنية التأسيس الوراثي للدنا وباستخدام نواقل الاستئصال البلازميدية.

وتمكن العالمان في الثاني من كانون أول عام 1980 من الحصول على أول براءة اختراع في حقن المواد الحية، وتعتمد التقنية على تقطيع الدنا بالإنزيمات القاطعة المناسبة وعزل الجينات المطلوب استئصالها وباستخدام نواقل مناسبة للاستئصال (Cloning Vectors) يتم إعادة لحم وارتباط الجينات المرغوبة والتي تشفر لإنتاج البروتين المطلوب ضمن جزيئة الدنا الناقل والحصول على جزيئة ناقل هجينة (Recombinant) والتي يتم إيلاجها فيما بعد في البكتريا بطرق مختلفة منها طرق التحول الوراثي، وهناك طرق متقدمة أخرى كالثقيب الكهربائي (Electroporation).

ونظراً لقصر زمن الجيل للبكتريا وتكاثرها السريع فإن أعداداً هائلة من النواقل ونسخ الجين المطلوب يمكن الحصول عليها في وقت قصير نسبياً.

هذا ولا تقتصر عملية الاستئصال الجيني على البكتريا، حيث يمكن استخدام التقنية في إنتاج الحيوانات عبر الوراثة، وكما سيرد ذكره في الفصل الرابع.

2 - الاستئصال الخلوي Cellular Cloning :

يتم الاستئصال الخلوي بفرز وفصل أو تفريق خلية واحدة ذات تركيب ووظيفة معروفة وشكل محدد تسمى النسيلة يتم تنميتها في أوساط زرعية نسيجية خاصة لغرض تنسيلها وبذلك تعطي نوعاً من واحدات من الخلايا المتميزة ذات التركيب والوظيفة المتماثلة، ويمكن استخدامها في عدد كبير من التطبيقات كالعلاج الجيني، وفي إنتاج الأجسام المضادة وحيدة النسيلة Monoclonal Antibody وفي دراسات التمايز الخلوي وتحول الخلايا الورمية.

3 - الاستئصال الجنيني Embryo or Fetal Cloning :

تعد هذه التقنية التي تسمى أحياناً بالانشطار الجنيني أحد التقنيات المهمة في الحصول على نسخ متطابقة تماماً من النسائل (توائم متماثلة) وتمكن العالم «ويلادسن» في عام 1985 من تطبيقها على الأغنام، وفي عام 1993 تم الحصول على 17 جنين بشري باستخدام هذه التقنية. ويقسم الاستئصال الجنيني إلى نوعين:

1 - الاستئصال بطريقة فصل الخلايا: وتكون الأجنة الناتجة متطابقة تماماً وذلك لأن مصدر المادة الوراثية هو واحد وقد تم تطبيق هذه التقنية على الضفادع والفئران والأغنام (الشكل 1 - 9 القادم) وأخيراً الإنسان.

2 - الاستئصال بتنشيط البويضة غير المخصبة: تعد هذه التقنية تطبيقاً لفكرة التكاثر العذري Parthenogenesis وتعتمد هذه التقنية على تحفيز وحث البويضة غير الملقحة على بدء التكاثر والانقسام ولا تزال هذه الطريقة قيد التجربة والاختبار.

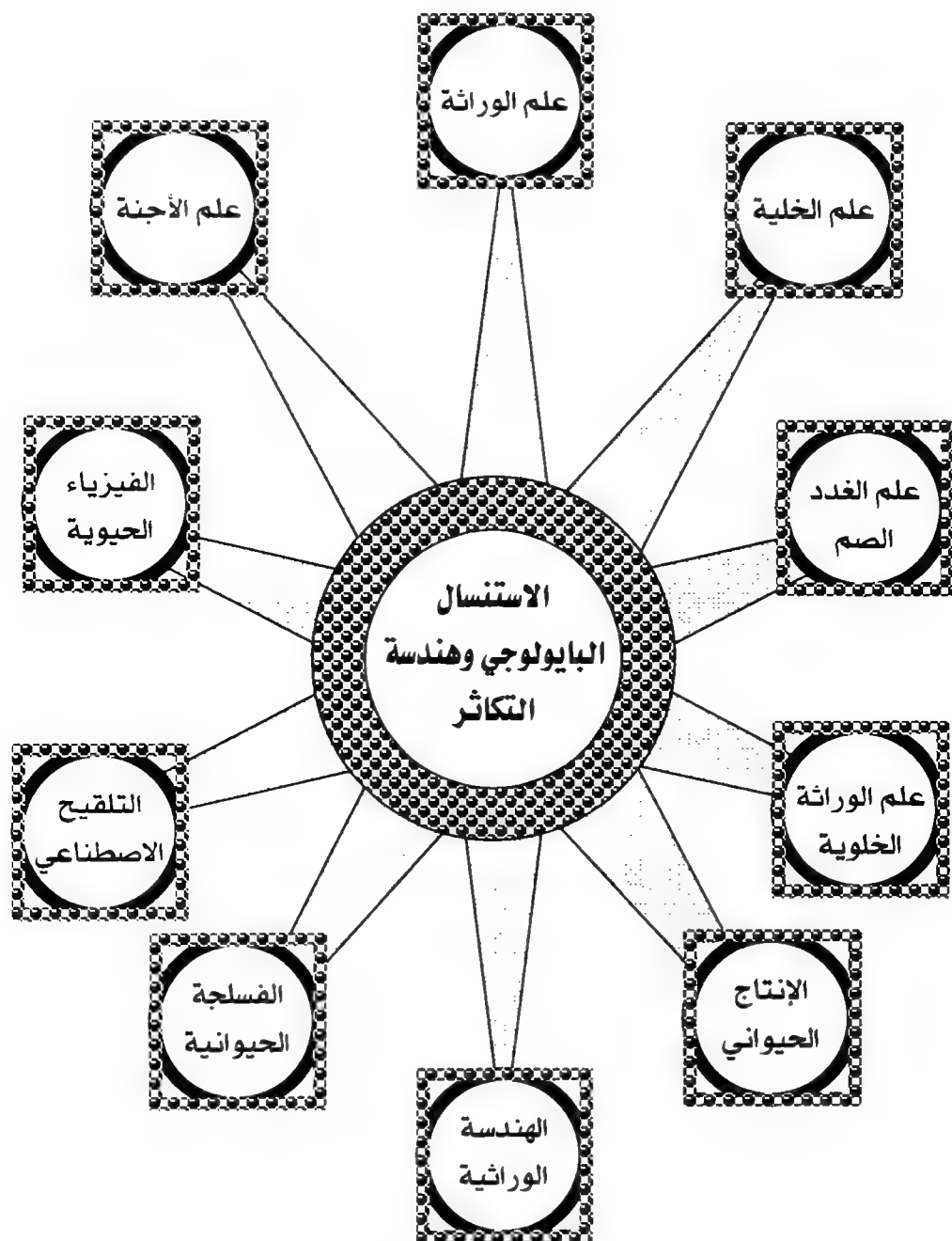
3 - الاستئصال بتنشيط الخلية الجنينية المتحدة مع البويضة منزوعة النواة: استخدمت هذه التقنية في عام 1995 من قبل «ويلموت» لاستئصال النعجتان «ميكان» و «موراك».

4 - الاستئصال بتقنية النقل النووي Nuclear Transfer :

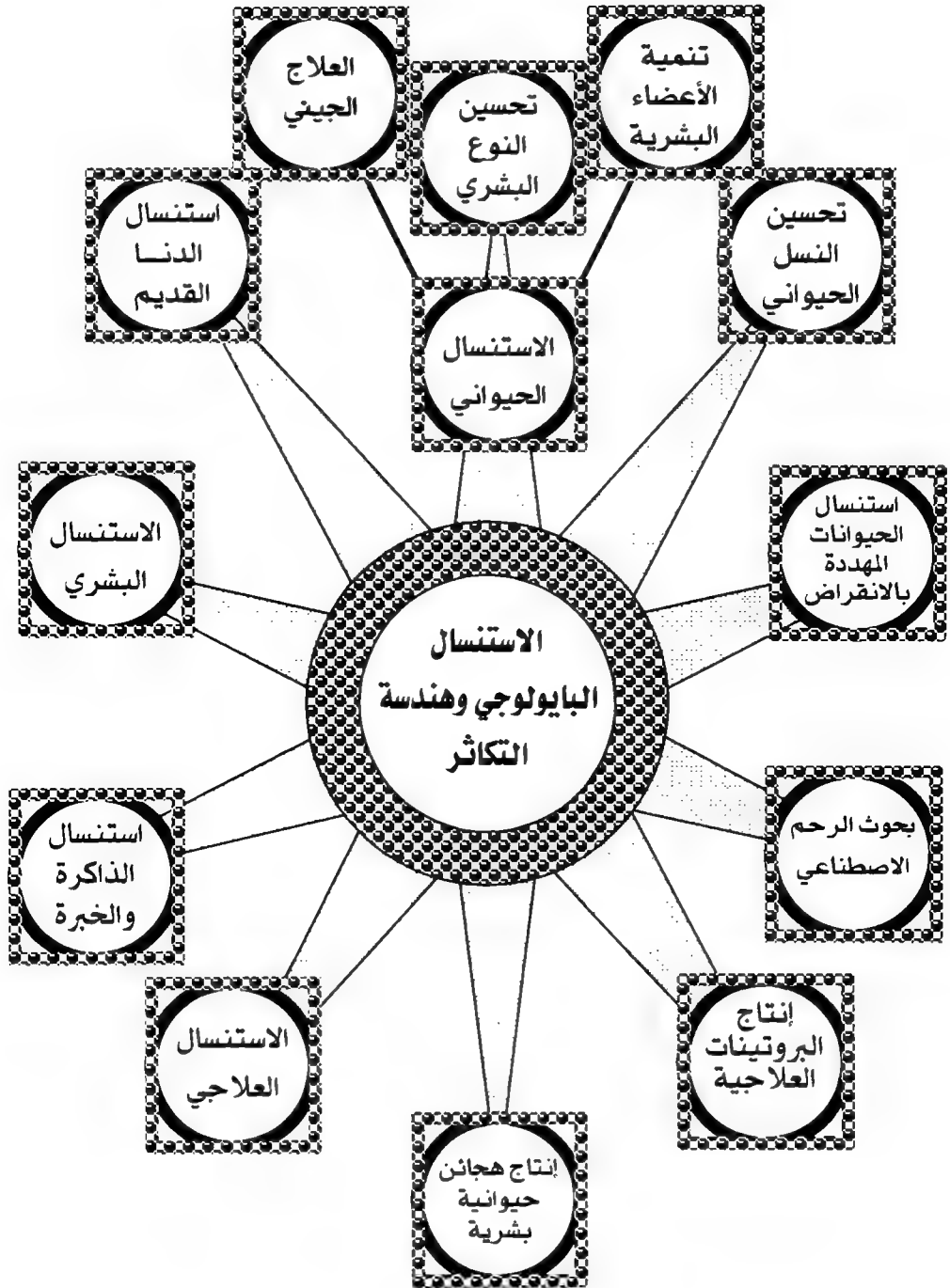
تعود هذه التقنية إلى عام 1952، حيث أجريت العديد من التجارب الناجحة على البرمائيات والضفادع خصوصاً وتعد هذه التقنية من أكثر التقنيات موثوقية (رغم أن نسبة النجاح ليست عالية) ولكن التجارب اللاحقة التي أعقبت استئصال النعجة «دولي» أعطت نسب نجاح بلغت في اليابان بحدود 80 %.

ويعمل العلماء على تطوير التقنيات المستخدمة والتي ترتبط بتقنيات تعود لعلوم مختلفة (المخطط 1 - 1).

إن الاهتمام المتزايد بتقنيات الاستئصال البايولوجي يتعلق بالمدى الواسع من التطبيقات التي توفرها هذه التقنيات (المخطط 1 - 2) والتي تتباين بصورة واسعة في إمكاناتها ودرجة واقعيتها أو تطرفها.



المخطط (1 - 1): ارتباط الاستنسال البايولوجي وهندسة التكاثر بالعلوم والتقنيات الأخرى



المخطط (1 - 2): التطبيقات المحتملة لتقنيات الاستنسال البايولوجي وهندسة التكاثر.

الفصل الثاني

التطور التاريخي

لتقنيات التحوير الوراثي

9

الاستنساخ البايولوجي

هندسة التكاثر

من القرن الثامن عشر إلى القرن الحادي والعشرين

لم يكن انبثاق تقنية الاستئصال البايولوجي واستئصال «دوللي» أول وأشهر نعمة في التاريخ على الإطلاق ولید المصادفة البحتة بل كانت نتيجة لبحوث مضية على فترات زمنية متباعدة واستمرت زهاء ثلاثة قرون، ولنعود قليلاً إلى تلك الحقبة من التاريخ وإلى القرن الثامن عشر بالتحديد لنجد أن أوروبا التي كانت غارقة في سبات العصور الوسطى وظلامها الدامس قد بدأت تفيق على أولى مراحل الثورة الصناعية الوليدة والتي سار معها جنباً إلى جنب تطور العلوم الطبية والمعرفة العلمية ومنها مجال يعرف الآن بـ «هندسة التكاثر» ويعنى هذا المجال بكافة التقنيات التي تتعامل مع موضوع الإخصاب والتكاثر وعلاج العقم، وأخيراً التكاثر اللاجنسي النسيلي أو الاستنساخ (Cloning)، ففي عام 1745 اكتشف العالم «بوينت» قدرة بيوض بعض الحشرات على النمو بصورة عذرية (بدون الحاجة إلى التخصيب من الذكر).

وفي العام 1780 حدث إنجازان مهمان، الأول هو تمكن العالم الإيطالي «سبالنزي» من تلقيح الكلاب اصناعياً، أما الإنجاز الثاني فكان أول تلقيح ناجح لامرأة بحيامن الزوج (AIH). أما في العام 1884 فقد شهد إنجازان آخران وهما تمكن العالم الإنكليزي «هيب» من تلقيح الكلاب والخيول اصطناعياً وإجراء أول تلقيح داخل الرحم (IUI) بحيامن متبرع.

وفي عام 1914 تمكن العالم الإيطالي «أمانتيا» من تصميم أول مهبل اصطناعي، أما في عام 1926 فقد شهد اكتشاف محفزات القند hCG, FSH, LH . وشهدت الحقبة الزمنية بين عامي 1930 - 1940 عدة محاولات للحصول على المحفزات من مصادر طبيعية (كالإدرار) وتحديد دورها والعوامل المؤثرة عليها. وفي هذه الحقبة أيضاً تطورت طرق التلقيح الصناعي بسرعة، إذ تمكن الروس من تلقيح قرابة 1.2 مليون بقرة و 15 مليون نعجة و 120 ألف فرس اصطناعياً في عام 1938، وفي عام 1947 تم استخلاص المحفز hCG من البول البشري، أما استخلاص المحفز hMG فقد تم استخلاصه من

بول النساء في سن اليأس في عام 1949، وشهد أواسط القرن العشرين وتحديدًا عام 1952 مولد علم التجميد البايولوجي، حيث استخدم الكحول والثلج الجاف في تجميد السائل المنوي، وشهد هذا العام إجراء أول عملية استئصال لصفادع من خلايا لفرخ الضفدع (الشرغوف) من قبل العالمين «روبرت بريكرز» و «توماس كنك»، وفي عام 1956 تم تصنيع الكلومفين (أول محفز صناعي للإباضة)، وتحقق عام 1958 نجاح كبير على يد العالم «كار كمزل» حين تمكن من تحفيز الإباضة باستخدام هرمونات بشرية مستخلصة من الغدد النخامية للجثث والتي كانت تستخلص بكميات ضئيلة حيث (لا تكفي الهرمونات المستخلصة من 50 غدة لخمسين جثة سوى لتحفيز دورة إباضة واحدة فقط)، وفي عام 1961 - 1965 تمكن العلماء من فك رموز الشفرة الجينية بأكملها.

وحدث التقدم الأكثر أهمية في تسارع استعمال محفزات القند في تحفيز الإباضة في عقد الستينات وتمكن العالم «جون كوردن» في عام 1962 من استئصال الصفادع من خلايا لشرغوف ضفدع أكبر عمراً، ، في عام 1978 حدث التطور الأكثر أهمية في تقنيات الإخصاب الخارجى، حين أعلن عن ولادة الطفلة «لويزا براون» وهي أول طفلة أنابيب تم ولادتها باستخدام التقنية التي أسسها العالمان «إدواردز و ستبتو» وحققت تقنيات التحوير الجيني تقدماً كبيراً حين أعلن في عام 1982 عن إنتاج الفأر والجرذى العملاق الذي تم تحويره جينياً باستئصال جين هورمون النمو. وفي عام 1983 تمت أول عملية نقل لجنين بشري من رحم أم إلى رحم امرأة أخرى، وتمكن العالم «رالف برنستير» من إنتاج إنثى خنزير لها القدرة على إنتاج هرمون النمو في حليبها، وحدثت أول معضلة قانونية لتقنيات هندسة التكاثر الجديدة في عام 1986 عندما فشلت «ماري بيث» الأم البديلة والملقحة اصطناعياً في محاولتها للاحتفاظ بالطفلة قانونياً. وفي عقد التسعينيات حدثت سلسلة من الخطوات المتلاحقة شملت :

- في عام 1993 : استئصال أول جنين بشري باستخدام تقنيات الانشطار الجيني .
- في عام 1994 : تمكنت شركتنا «سيرونو و اوركانون» من إنتاج الهرمونات المحفزة للإباضة بطرق الهندسة الوراثية .
- في عام 1995 : ولادة أول حملين مستنسلين من خلايا جنينية مشتقة من جنين عمره (١) أيام سميًا «ميكان» و «موراك» في معهد روزالين/ اسكتلندا .

- ثم في عام 1996 : فقد تم استئصال القروود لأول مرة من خلايا جنينية من قبل العالم «دونالد وولف» من مركز بحوث اوريجون الإقليمي للرئيسيات.
- ثم حدث في عام 1996 : التطور الحقيقي لعملية الاستئصال، إذ نجح العالم «إيان ويلموت» وزملاؤه باستئصال النعجة «دوللي» وسميت باسم المطربة «دوللي بارتون» وأعلن عن ولادتها في شهر شباط 1997 في معهد روزالين/ اسكتلندا.
- في عام 1996 : تم الإعلان عن إنتاج البقرة «روزي» التي تحمل مورثات بشرية تشفر لإنتاج حليب مدعوم بأحد الأحماض الأمينية الأساسية.
- في عام 1997 : تبرع ملياردير مجهول بمبلغ 2.3 مليون دولار إلى جامعة (أي.تي. أم) في كوليدج ستيشن/ هيوستن) خصصها لأبحاث الاستئصال، وبدأت بعدها شركة «جينيتكس سيفينغس اندكلون جي. اس. سي» تعلن عن دخول سوق استئصال الحيوانات الأليفة كالقطط والكلاب.
- في عام 1997 : تمكن العالمان «توريهيكو وأكياما» و «ريوزو ياناغيماشي» من جامعة هاواي من استئصال فئران إناث.
- في شهر آذار 1997 : أعلن الاتحاد الوطني للجمعيات التعاونية الزراعية الياباني عن تقنية جديدة لإنتاج 200 نسخة متطابقة من العجول.
- في 26 نيسان 1997 : أعلن في سويسرا عن إنشاء أول شركة للاستئصال البشري سميت (شركة المغامرة الشجاعة).
- في 9 تموز 1997 : ولدت النعجة المستئصلة «بوللي» مع أربع نعاج مستئصلة أخرى في معهد روزالين (تم الدمج بين تقنية الاستئصال وتقنية التحوير والتعديل الجيني) وتحمل «بوللي» جينات بشرية تشفر لبروتين الألفا أنتي - ترسين.
- في 26 تموز 1997 : أعلن العالم نيل فيرست من جامعة وسكونسن عن تطوير تقنية جديدة لاستئصال المواشي من خلية ناضجة.
- في شهر آب 1997 : أعلنت شركة (كلوبال أ. ب. س) في ديفورست/ وسكونسن عن استئصال عجل أطلق عليه «جين».
- في شهر آذار 1998 : أعلن عن استئصال البقرة «ماركاريتا» في مركز البحوث الزراعية الفرنسي.

- في 24 نيسان 1998 : ولد الحمل «بوني» Bonnie وهو أول ولادة ناجحة للنعجة «دوللي».

- في 14 أيلول 1998 : تم في اليابان استئصال العجل Y35 من خلية ناضجة انتزعت من أذن ثور من قبل العالم الياباني «تاكاهارو يوشيا» من مؤسسة كافغوشيما في جنوب اليابان.

- في 30 أيلول 1998 : حصلت مطلقة على أول حكم قضائي بتدمير أجنحتها المجمدة.

- في شهر كانون أول 1998 : أعلن العالم الكوري الجنوبي «لي يون» عن نجاحه في استئصال أول جنين بشري مكون من أربع خلايا انطلاقاً من بويضة مفرغة من النواة ونواة من إحدى خلايا المرأة الجنسية؟

- في 9 كانون أول 1998 : توصل العالم الياباني «يوكيوكاتو» من معهد العلوم والتكنولوجيا في نارا إلى تقنية استئصال فعالة بنسبة 80 % نجاح، حيث تم استئصال 8 عجل من 10 محاولات.

- في كانون الثاني 1999 : أعلن عالم الأحياء «كريغ فتر» عن نواياه في تخليق جسم عضوي صناعي في المختبر، وأثار إعلانه ضجة كبيرة، ولكن مدير شركة Celleria Genomics أعلن أن الأمر لا يتعلق بتخليق جنس بايولوجي جديد وإنما لتوضيح وتحديد ماهية الحياة.

- في 3 آذار 1999 : أعلن عن ولادة الطفل «اليساندرودي غريغوريو» ذو مصدرين وراثيين من الأم وأب واحد في مركز «ارتس» للإخصاب الصناعي في إيطاليا.

- في 15 آذار 1999 : صرح «ستيفن هوكينغ» عالم الفيزياء والفلك في جامعة كامبردج «بأنه لا مفر من كائن بشري معدل جينياً ومنقح ومحسن خلال القرون القادمة».

- في شهر مايس 1999 : أعلن في اليابان عن استئصال بقرتين من خلايا عائمة في أول إفراز للحليب أنتجته البقرة الأم بعد الولادة دون نزع خلايا من جسم البقرة قد تؤدي إلى مضاعفات.

- في 6 مايس 1999 : أعلنت شركة «جيرون» الأمريكية عن اندماجها مع شركة «بي.بي. ال. ثيرايبوتكس» في معهد روزالين.

- في 9 مايس 1999 : تمكن العلماء بنجاح من إنتاج ضفادع دون دماغ أو جهاز عصبي، مما يعني إمكانية تربية أعضاء بشرية داخل المختبر (أجنة قطع غيار).

- في 14 مايس 1999 : الملياردير المصري «محمد الفايد» يعلن عن رغبته باستئصال نفسه مئة مرة لإغاضة البريطانيين.

- في 27 مايس 1999 : نجح علماء معهد (MIT) في تنمية أجزاء من يد إنسان بعد نجاحهم في تنمية الأذن والأنف على وسط ساند.

- في 27 مايس 1999 : تم الكشف عن شيخوخة النعجة «دوللي»، حيث اعترف العالم «إيان ويلموت» بأن عمر «دوللي» الحقيقي هو تسع سنوات وهو ذات عمر النعجة الأصلية التي أخذت منها خلية الضرع التي تم استئصالها ونقل نواتها، حيث أظهر الفحص الدقيق أن نهايات الصبغيات في منظومتها الوراثية متقاصرة، وتم الاستنتاج بأن موروث الحيوانات المستنسله هي من عمر الحيوان الذي استنسلت منه بغض النظر عن الطريقة المستخدمة في الاستئصال.

- في 17 حزيران 1999 : أعلن علماء شركة تقنيات الخلية المتقدمة في ولاية ماساشوستيس عن استئصالهم لجنين ذكر مؤلف من حوالي 400 خلية، ولكنهم أحرقوه بعد يومين، وصرح أحد العلماء بأن الشركة استنسلت أول جنين بشري في شهر تشرين الثاني 1998 وتم حرقه بعد مرور اسبوعين.

- في 19 حزيران 1999 : أعلن عن أول جنين خيمري من البشر والبقر. إذ تم حقن نواة انتزعت من خلية جلد بشرية من الساق في بويضة بقرة مزالة النواة ولكنها لا تزال تحوي دنا مايوتوكندريا في الساييتوبلازم من أصل بقري.

- في 22 حزيران 1999 : أعلنت صحيفة «تشاينا ديلي» الرسمية الصينية أن علماء صينيين تمكنوا بنجاح من استئصال أول جنين لدب الباندا، حيث تم حقن نواة الخلية الجسمية للباندا في بويضة أرنب، ولكن المشكلة الأساسية تتمثل بإيجاد حيوان مضيف مناسب لاحتضان الجنين، حيث أن أنثى الباندا نادراً ما تكمل فترة الحمل وبسبب اختلاف الحجم وفترة الحمل ولا يمكن بالطبع استخدام أنثى الأرنب في هذه العملية.

- في 27 حزيران 1999 : نجح باحثون كنديون من جامعة اونتاريو في كندا في إنتاج جيل جديد من الخنازير الصديقة للبيئة، حيث تم تحويلها وراثياً بحيث احتوى روثها على كمية أقل من الفسفور بحدود 50% - 20 عن نظيراتها وأطلق على الخنازير المحورة وراثياً أسماء «جاك» و «غوردي» و «واين» وهي أسماء ثلاثة من أشهر لاعبي الهوكي في كندا.

- في 29 حزيران 1999 : نجح العالمان «واكياما ويانا جيماشي» من جامعة هاواي ولأول مره في استئصال فأر ذكر سمي بالفأر «فاييرو» نسبة إلى خلايا الفاييرو بلاست التي استئسل منها والتي أخذت من ذنب فأر ذكر.
- في 13 تموز 1999 : نجح باحثون من ألمانيا والولايات المتحدة في استخدام خلايا جذعية جنينية لإصلاح خلل في الدماغ والنخاع الشوكي (خلايا جذعية من أجنة في اليوم الثالث، وزرعت في وسط سهل تحويلها إلى خلايا عصبية).
- في عام 1999 : أعلن الفيزيائي «ريتشارد سيد» عن إنشاء عيادة للاستئصال مقابل ثمن.
- في شهر أيلول 1999 : تمكن العالم «مارك وستيهوتسن» في الولايات المتحدة من استئصال عجل من جلد ثور مات قبل سنة وتم الاحتفاظ بخلاياه الجلدية، وبعد محاولات فاشلة نجحت عملية الاستئصال للعجل والذي سمي «فرصة ثانية» Seconed chance .
- في تشرين أول 1999 : تم الإعلان في أحد مواقع شبكة الانترنت عن مزاد لبيع بويضات ملكات جمال وعارضات أزياء جاهزة للإخصاب وبأسعار تتراوح بين 15 ألف - 75 ألف دولار.
- في تشرين أول 1999 : تم شفاء قروود مصابة بمرض باركنسون (عطل إنتاج الدوبامين) بعد زراعة خلايا نسيج عصبي من خنازير سليمة.
- في شهر تشرين أول 1999 : تمكن العالم «فرانسوا بوتيسي» وفريقه البحثي في مركز أبحاث علوم الأحياء والتكاثر في جامعة لافال في كيبك/ كندا، من إنتاج البروتينات العلاجية في كائنات حية أخرى ذات قدرة على إفراز كميات كبيرة من السائل المنوي.
- (تنتج الخنازير بحدود 300 مليلتر من السائل المنوي في كل دفقة) أما القيل فينتج بحدود 3- 5 ألتار، أما الفئران والتي أنتجت هرمون النمو والعامل الوراثي C12 فتنتج 5 مليغرام/مل فقط لكل دفقة.
- في شهر كانون أول 1999 : أعلن المكتب العلمي لمعهد الصحة القومي (NHI) الأمريكي مسودة الشروط الواجب توفرها في بحوث الخلايا المأخوذة من أجنة بشرية وبحوث الجينات.
- في شهر كانون أول 1999 : منح مكتب ميونيخ لبراءات الاختراع البراءة لجامعة أدنبرة وكانت تبحث في تغيير الخلايا والأجنة البشرية.

- في 16 كانون الثاني 2000 : أعلن في إسبانيا عن انقراض سلالة نادرة من الماعز الجبلي. ولكن العلماء أخذوا عينة نسيجية من الأنثى الوحيدة التي كانت على قيد الحياة لغرض استنساخها.

- في 27 كانون الثاني 2000 : نجح فريق بحثي ياباني بقيادة العالمان «تاكاهارو يوشيا» و «نوريو تابارا» في تقنية إعادة الاستنساخ، حيث نجحوا في استنساخ عجل من إذن عجل مستنسل ولأول مرة على مستوى الحيوانات الاقتصادية الكبيرة (تم استنساخ فئران من فئران مستنسل) ويمكن أن توفر العجول المستنسلات معلومات عن «معدل الشيخوخة».

- في كانون الثاني 2000 : تمكن العالم «توبوكو أوشيكا» من شركة الخلايا الجذعية Stem Cell Co. من عزل خلايا دماغية بشرية لأول مرة، حيث تم زراعة الخلايا في «أدمغة» الفئران، حيث تطورت إلى خلايا عصبية متخصصة.

- في 2 شباط 2000 : اكتشف علماء فرنسيين أن السكر تريهالوز قادر على حفظ الخلايا المجففة وإعادتها للحياة بعد أيام ومن دون آثار سلبية، حيث يحيط السكر بالجزئيات الكبيرة مشكلاً غطاء عازلاً عند جفاف الماء ويتطلب استخدام هذا السكر في حفظ الخلايا البشرية إيجاد وسيلة أنزيمية لنقل هذا السكر عبر غلاف الخلية لحفظ نواتها.

- في 27 شباط 2000 : احتجت وزيرة الصحة الألمانية على منح مكتب ميونيخ لبراءات الاختراع (البراءة لجامعة أدنبرة) التي قدمت بحثاً يخص تغيير خلايا وأجنة بشريا وتتضمن طرقاً علمية لإنتاج إنسان معدل جينياً.

- في 7 آذار 2000 : نجح العالم الياباني «كيا سوميزوكامي» من مركز اساهكياوا الطبي في زرع مبايض بشرية في الفئران مما جعلها قادرة على إنتاج بويضات بشرية، وتمت التجربة بأخذ مبايض من ثلاث نساء أمريكيات يعانين من أمراض في الرحم، حيث تم استئصال المبايض وتقطيعها إلى قطع مربعة لا تتجاوز عرضها مليمترين، حيث تم زرع ما مجموعه 108 منها إضافة إلى خلايا بشرية كامنة القدرة لها القدرة على النمو والتخصص والتحول إلى خلايا بيوض بشرية وتمت عملية الزرع تحت الجلد لبطن الفئران والتي يمكن تحفيزها هرمونياً لتسريع نمو الأنسجة المغروسة والتي تحولت إلى خلايا ركمية بعد اسبوعين.

- في 16 آذار 2000 : أعلنت شركة P.P.L.Theraputics عن ميلاد 5 خنازير مستنسلية وهي سابقة تحدث لأول مرة حسب تعبير الشركة ويمكن أن تؤدي دوراً مهماً في تزويد الإنسان بأعضاء الخنازير (تمت عملية الاستئصال بالنقل النووي) وإن الشركة سوف تغطي جزء من السوق الواسعة لتجارة الأعضاء البالغة بحدود 6 مليار دولار خصوصاً بعد التغلب على مشكلة رفض الأعضاء المغروسة بإنتاج خنازير ذات خلايا خاملة جينياً ومناعياً.

- في 5 نيسان 2000 أوصت الهيئة الاستشارية للأخلاقيات الطبية البريطانية باستئصال الأجنة لأغراض علاجية وقد اتفق هذا الموقف مع موقف الجمعية الملكية البريطانية التي أعلنت أيضاً تأييدها لتعديل القوانين المتعلقة ببحوث الأجنة، ومنها قانون صدر في عام 1990 حول الخصوبة وعلم الأجنة والذي يجيز إجراء البحوث حول الأجنة البشرية ولغاية اليوم الرابع عشر فقط ولا يتضمن مفردة الاستئصال أو الاستئصال العلاجي.

- وفي 5 نيسان 2000 : أعلن العلماء في أستراليا عن نجاحهم في تطوير الخلايا العصبية المشتقة من الأجنة البشرية، حيث تمكنوا من تطوير الخلايا العصبية المشتقة من أعصاب ساق الجنين لغرض استخدامها في علاج مرض الشلل الارتعاشي «باركنسون».

- أما في 20 مايس 2000 : فقد أعلن عن نجاح علماء جامعة ميشغان في التوصل إلى تقنية زرع جيدة أمكن من خلالها إنتاج عظام بما تحتويه من غلاف خارجي صلب والنخاع الإسفنجي، حيث تم أخذ عينة من نسيج الجلد في الجرذان وزراعتها في المختبر ومن ثم تحويل وتعديل الخلايا لإنتاج مادة بي أم بي 7 البروتينية، فتم الحصول على عظام هجينة خلاياها من الجرذان والإنسان.

- وفي 20 حزيران 2000 : أعلن عن ميلاد ماعز مستنسل من خلايا بالغة في الصين ولكنها سرعان ما نفقت بعد أن واجهت مشاكل في الجهاز التنفسي، وفي 23 حزيران 2000 أعلن عن ولادة ماعز أخرى أطلق عليها اسم «يانغيانغ» وتزن 2.6 كيلوغرام وبطول 33.5 سم، وتم الاستئصال باستخدام تقنية مختلفة عن تلك التي استخدمت في استئصال «دوللي»، إذ اعتمدت التقنية الصينية في الاستئصال على أخذ خلايا من أذن ماعز بالغة وبويضات غير ناضجة من ماعز مذبوحة.

الفصل الثالث

تقنيات التطويع المجهري

9

الاندماج الكهربائي

3 - التقنيات التحضيرية في التطويع المجهرى

Preparative techniques in Micromanipulation

حقق التطويع المجهرى نتائج مذهلة في مجال الاستئصال البايولوجي والتحويل الجيني للخلايا الحية، وتعود تقنيات التطويع المجهرى إلى القرن التاسع عشر وتحديدًا إلى عام 1859 م، إذ استخدم العالم شمدت (H.D. Schmidt) لأول مرة في هذا العام المشراح المجهرى Microscopic dissector، ومنذ ذلك الحين اكتسبت تقنيات التطويع المجهرى وبصورة متزايدة الكثير من الأهمية والتكامل من خلال التطوير المستمر للأدوات المجهرية الحساسة والدقيقة، ولغرض التوصل إلى مفهوم أكثر عمقاً وشمولية لهذا المجال الحساس من التقنيات المجهرية، لا بد من وضع تعريف دقيق لمصطلح التطويع المجهرى Micromanipulation، حيث يستخدم هذا المصطلح ليتضمن كل التقنيات والعمليات التي يتم إنجازها في مجال الرؤية في الحقل المجهرى سواء تم التطويع للخلايا الحية باستخدام وسائل بسيطة أو بمساعدة أجهزة أو وسائل غاية في التعقيد.

إن التقسيم الكامل والواضح للفوائد التي يتم الحصول عليها من تقنيات التطويع المجهرى يجب أن تأخذ بنظر الاعتبار العديد من العمليات الدقيقة التي يمكن إجراؤها بمعزل عن استخدام اليد البشرية ولكن بمساعدة العين من خلال التكبير البصري والذي يعطي فهماً دقيقاً وصورة محددة لنقطة الأداء 'Tool point' والجسم object. وبين عامي 1904 و 1914 طور العالم باربر (M.A.Barber) حاملاً لماصة آلية Mechanical pipette holder وأسلوب خاص لعزل الأحياء المجهرية من خلال تطويع الماصة الدقيقة Micropipette في قطرة معلقة من تحت سطح لشريحة غطاء معلقة فوق حجر رطبة، وبذلك نجح في ابتكار أسلوب جديد يمكن من خلاله الحد من جميع العوائق والعقبات بين العينة والعدسة الشيئية ويسمح باستخدام قوة تكبير أعلى.

أدى التطور الكبير في تصميم المجاهر واستخدام المجهر المعكوس أو المقلوب Inverted Microscope فإن عمليات التطويع المجهرى أمكن استخدامها بصورة مناسبة في قطرات موضوعة في أطباق بترى أو على شريحة مجهرية موضوعة على مسرح المجهر

Microscopic Stage وبسبب عكوسية المجهر فإن العدسة الشيئية تحتل موقعا تحت الطبق أو الشريحة ، في حين تتموضع القطرات السائلة فوقه وهذا يتيح ملاحظة ملائمة لكافة أرجاء الحقل المجهرى ، وهذا الوضع يتيح أيضاً استخدام الأدوات الدقيقة العاملة Operat ing microtools ذات القمة المنحنية بزاوية أفقية وأن تصل إلى العينة من الأعلى ، ومن الفوائد الأخرى للمجهر المعكوس هو إمكانية استخدام قطرة أكبر حجماً والتي يمكن تغطيتها بزيت البارافين لتقليل تأثير التبخر ، وحيث أن العينة تستقر على السطح العلوي لطبق بترى الساند أو الشريحة المجهرية مما يجعل التطويع المجهرى أكثر سهولة .

أثبت التطويع المجهرى الحيوى أهمية عظيمة ومتنامية في العديد من مجالات علوم الحياة المختلفة كعلم الأجنة وعلم فسلجة الخلية وعلم البكتريا وعلم الخلية التجريبي ، وفي مجال هندسة التكاثر استخدمت تقنيات متعددة شملت تقنية إمناء المنطقة (SUZI) Subzonal Insemination وتقنية تشريح المنطقة الجزئي Partial Zona dissection وتقنية كسر أو صدع الزونا Zona breaching والتقنيات الأخرى والتي تستخدم الآن في التجارب أو الاختبارات السريرية لتقنيات التكاثر البشري وفي الاستخدامات السريرية في التشخيص السابق للغرس Pre - implantation diagnosis للاعتلالات الوراثية المرتبطة بالكروموسومات ، ويعتمد اختيار التقنية والأسلوب المناسب على نوع المشكلة المطلوب بحثها .

3- 1 - 2 تطبيقات التطويع المجهرى:

تباين وتنوع تطبيقات التطويع المجهرى لتشمل عدد كبير من المجالات المختلفة كالدراسات النووية والبحث على أشكال قيمة في الفن وفي فن التصميم وفي الدراسات المتعلقة بتلوث الهواء والتلقيح الاصطناعي Artificial Insemination ، وعموماً يمكن وضع هذه التطبيقات ضمن المجالات العامة الآتية :

- 1 - تحضير العينات من المواد غير الحية Non Biological Material .
- 2 - التجريب الكيميائي Chemical Experimentation .
- 3 - التطويع والتعامل مع الخلايا الحية والأنسجة .

3 - 1 - 3 الجراحة المجهرية لأجنة الحيوانات الكبيرة:

اكتسب التطويع المجهرى لأجنة الحيوانات الكبيرة أهمية كبيرة ونال اهتماماً واسعاً بين الباحثين ومنتجي الحيوانات الاقتصادية، إذ تغير المفهوم الذي كان سائداً حتى عقد السبعينيات من القرن المنصرم بعدم قدرة أجنة الحيوانات المزرعة (على عكس أجنة الحيوانات المختبرية) على البقاء والنجاة وإنتاج زريعات أو غرسات Transplant عقب تعرضها لتقنيات التطويع المجهرى، إذ أثبتت الدراسات اللاحقة وفي عقد الثمانينيات تحديداً أن التويطة Morula والكيس الأريمى Blastocyst لأنواع حيوانات المزرعة يمكنها البقاء والحياة عقب الجراحة المجهرية ويمكنها التطور لاحقاً داخل الرحم In Utero منتجة ذرية offspring حية (عيوشة) Viable من إناث حاضنات بديلة Surrogate females. وتم تطوير مجموعة من تقنيات الجراحة المجهرية المتقدمة والتي تستخدم الآن بصورة روتينية في مختبرات غرسات الحيوانات التجارية ومنها:

1 - التشريح المنطقي الجزئي لإخصاب أنابيب الاختبار Partial Zona dissection for in vitro Fertilisation (IVF).

2 - أسلوب نقل كتلة الخلايا الداخلية Inner cell mass Transfer.

3 - أسلوب إنتاج أجنة كيميائية Chimaeric Embryos للاستخدام المحتمل في الإنتاج الحيوانى مستقبلاً.

أجريت الدراسات على التطويع المجهرى لأجنة اللبائن وتقييم القابلية على التطور لقسيمات أرومية مفردة معزولة من الأطوار المبكرة لأجنة الأرناب في عام 1936 من قبل العالم (G. Pincus) وفي عام 1942 تم إجراء التطويع المجهرى لأجنة الجرذان من قبل العالمان نيكولاس وهال (G.S.Nicholas and B.V.Hall) في حين تأخر تطويع أجنة الفئران مجهرياً لغاية 1959 والذي تم إجراؤه من قبل العالم تاركويسكي (AK.Tarkowski) وبينت هذه الدراسات اللاحقة أن القسم الأرومي المفرد للأطوار الجنينية المبكرة للبائن (التي هي أصغر أو مساوية لثمان خلايا) كان كامناً (وافر الجهد أو الفعالية) Totipotent مع وجود احتمالية قائمة لإنتاج ذرية متعددة من جنين واحد، ولكن العقبة الرئيسية كانت تتمثل بانعدام القدرة على إعادة تضمام Recompaction أطوار الجنين للبقاء داخل الحي in vivo في حالة إصابة الغطاء الواقى للبيضة Zona Pel- (ZP)

lucida بضرر جزئي أو كلي، وقد تم تجاوز هذه العقبة الكبيرة من خلال نجاح العالم ويلادسن (S.M. Willadsen)، في عام 1979 في تطوير تقنية الطمر بهلام Agar Embedding Techniques وتضمن الأسلوب فصل القسيمات الأرومية في الأطوار الجنينية المبكرة بالجراحة المجهرية ونقل واحد أو أكثر من القسيمات الأرومية من أحد هذه الأجنة إلى الأغشية الواقية للبيضة والمفرغة (Evacuated (ZP ثم تطمر القسيمات الأرومية المفصلة والمحتواة ضمن الأغشية الواقية البديلة (الحاضنة) (Surrogate (ZP في الهلام Agar Chips، ثم تنقل هذه القسيمات الأرومية المطمورة بهلام إلى أجنة البيض اللاحمة ligated oviducts لعلاج في الدورة الشبقية، لكي تستمر في نموها وتطورها اللاحق داخل الحي. وبعد وصول الأجنة إلى طور التويته أو طور الكيسة الأديمية يتم استرداد الأجنة المطوعة مجهرياً من المضيف الوسطي Intermediate Host وإزالتها بعناية من الهلام ونقلها إلى المستلمات ذات الخصوصية لإكمال تطورها، حيث استخدم هذا الأسلوب في إنتاج أول مجموعة من توائم الحملان المتماثلة من أجنة ذوات ثماني خلايا، واستخدام هذا المنهج التقني فيما بعد لإنتاج التوائم المتماثلة الأولى من العجول Calves ومجموعة من توائم من أجنة بقرية في اليوم الخامس إلى اليوم السادس وبطرق غير جراحية.

3 - 1 - 4 تصنيف وشطر الأجنة لإنتاج التوائم :

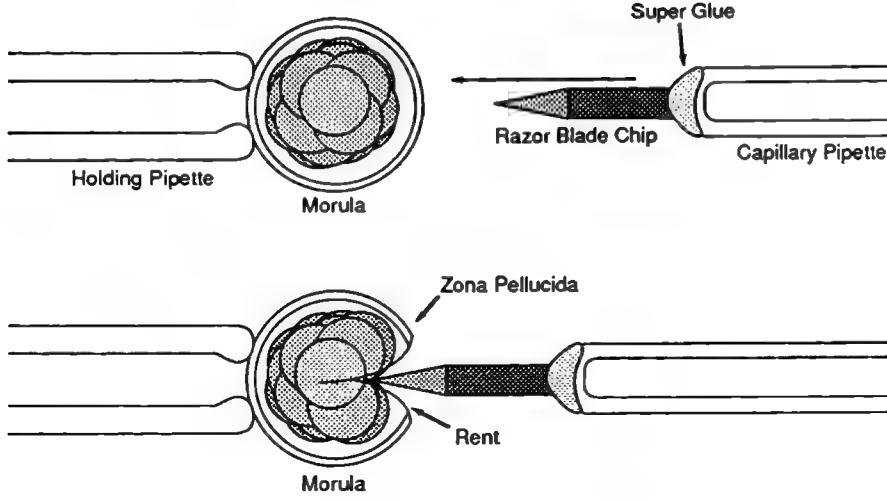
Embryo bisection to Produce twins

تعد تقنية الطمر بهلام من الطرق الممتازة للتطويع المجهري وكوسط زرع للأطوار المبكرة من الأجنة وبالرغم من المزايا القيمة لهذا الأسلوب فإن أغلب الباحثين لا يعدون هذا الأسلوب عملياً بما فيه الكفاية للاستخدام الروتيني في مراكز غرس ونقل الأجنة. وفي العام 1982 تمكنت ثلاث مجاميع بحثية مستقلة، كل على حدة من تطوير أساليب وتقنيات جديدة للتطويع المجهري، حيث وصف الباحث أوزل (Ozil) وجماعته من فرنسا تقنية لإنتاج أجنة (مشطورة) باستخدام إبرتين زجاجية مجهرية، ويتم فتح الغطاء الواقى للبيضة (ZP) وإزالة كتلة الخلايا الجنينية من تجويف الـ (Zona) باستخدام ماصة زجاجية ناقلة Glass transfer pipette ومن ثم شطر الجنين الخال من الغطاء الواقى باستخدام مشرط أو مبضع وإحلال الأنصاف في أغشية واقية مفرغة باستخدام الماصة الناقلة، باستخدام هذه التقنية فإن 14 من الكيسات الأرومية المبكرة تم شطرها ونقلها بصورة غير

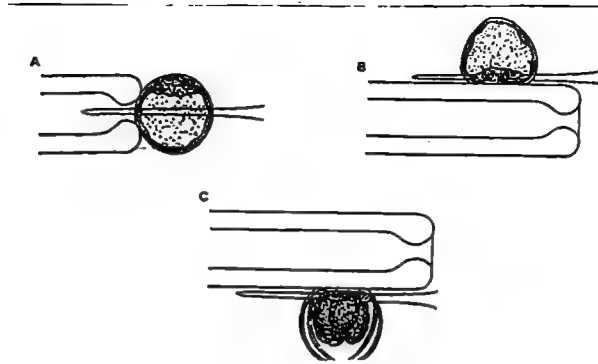
جراحية إلى 14 من الحيوانات المستلمة منتجة نسبة حمل بلغت 64.2 % ونسبة توأمة بلغت 66.6 % ، وفي العام ذاته (1982) نشر مجموعة من الباحثين من جامعة لويزيانا حكومية (LSU) أسلوباً آخر لشطر الأجنة البقرية التي تم جمعها بطرق غير جراحية، وباستخدام إبرة مجهرية دقيقة لعمل شق أو مزقة Rent في الغطاء الواقي (ZP) وإزالة كتلة الخلايا الجنينية باستخدام الإبرة الزجاجية المرنة، حيث يتم تصنيفها وشطرها على صفيحة شاقولية مستقرة في قعر طبق بتري Petri dish، يعقبها نقل كل نصف جنين (demi - embryo) إلى أغشية واقية مفرغة، وباستخدام هذا الأسلوب تم نقل ثمان أزواج من أنصاف الأجنة وستة أنصاف أجنة مفردة ونقلت بصورة غير جراحية إلى 14 من الأبقار المستلمة وأظهرت أنصاف الأجنة التوأمة المنقولة نسبة حمل بلغت 62.5 % ، أما أنصاف الأجنة الفردية المنقولة فقد أنتجت نسبة حمل بلغت 16.6 %، وحقق الباحث وليامس (Williams) وجماعته من جامعة كولورادو الحكومية (CSU) نجاحاً في استنباط أسلوب تقني جديد في شق الأجنة البقرية المحتواة ضمن الغطاء الواقي للبيضة (ZP) باستخدام رقاقة نصل الموس Razor blade chip (الشكل 3 - 1) والمثبت بصمغ قوي Super glue على ماصة زجاجية شعرية صغيرة. Glass Capillary Pipette لشطر وتنصيف الجنين السليم الكامل، تنقل بعدها أنصاف الأجنة (demi - embryo) وباستخدام ماصة زجاجية دقيقة إلى أغشية واقية (ZP) مفرغة، وباستخدام هذه التقنية تم شطر 20 جنيناً بقرية ذا مواصفات جيدة (بعضها في طور التوتية وبعضها يعود إلى طور الكيس الأريمي المبكر) ونقلت هذه الأجنة كأزواج أنصاف أجنة أما بطريقة جراحية أو غير جراحية إلى 20 من الماشية المستلمة وأسفر 14 من عمليات النقل الجراحي و 6 من عمليات النقل اللاجراحي لأنصاف الأجنة عن نسب حمل بلغت 64 % و 17 % على التوالي، ونظراً لبساطة هذا الأسلوب فقد تم تربيته من قبل مراكز ووحدات غرس الأجنة التجارية.

تعد الأساليب الثلاثة آنفة الذكر من الأساليب الكفؤة لتصنيف أجنة حيوانات المزرعة وإنتاج ذرية حية من أشقاق الأجنة ومن الأساليب الأخرى المبسطة لتصنيف الأجنة والقابة للتطبيق بسهولة هي تقنية تنصيف الطور الجنيني لمبكر (الكيس الأريمي) إلى جزئين باستخدام إبرة زجاجية دقيقة للقطع خلال كتلة الخلايا الداخلية (الشكل 2-3)، وأثبت الأسلوب كفاءة جيدة، إذ بلغت نسبة الحمل لأنصاف الأجنة المنقولة بحدود 89 % .

Embryo bisection to produce twins



الشكل (1-3): التنصيف الثنائي للتويّة، يتم تنصيف طور التويّة الجنيني ثنائياً إلى جزئين باستخدام رقاقة نصل الموس Razor Blade chip المتصلة بماصة شعريّة زجاجية باستخدام الشيت بالصمغ.



الشكل (2-3): تنصيف الطور الجنيني المبكر (الكيس الأريمي) إلى جزئين باستخدام إبرة زجاجية دقيقة للقطع خلال كتلة الخلايا الداخلية وباستخدام الجدار الخارجي للماصة الزجاجية الداعمة.

وفي مختبرات جامعة ولاية لويزيانا (LSU) تمكن الباحث روري (R.W.Rorie) في عام 1986 من تطوير تقنية فعالة لا تعتمد على استخدام أجهزة ووحدات التطويع المجهرى التجارى فى التنصيف السريع للجنين الكامل ويعتمد الأسلوب على وضع الجنين الكامل فى قطرة مجهرية microdrop من الوسط الحامل فى شريحة مجهرية وباستخدام نصل شفرة الموس Razor blade المسوكة بزواج من المرقآت (قاطعة النزيف)، حيث يتم تنصيف الأجنة، وبينت النتائج أن نسبة عالية من الأجنة البقرية السليمة بلغت بحدود 98% تم تنصيفها بنجاح باستخدام هذا الأسلوب، ويعد هذا الأسلوب من الأساليب سهلة التطبيق والتعلم وغير المكلفة.

3 - 1 - 5 نسبة الحمل من الأجنة المنصفة:

توجهت جهود الباحثين فى السنوات الأخيرة نحو تحديد العوامل المساهمة فى نسبة الحمل المثلئ من الأجنة المنصفة، ومن هذه العوامل هى نوعية الأجنة، إذ بينت النتائج أن نقل أنصاف الأجنة demi - embryos الناتجة من أجنة ذات نوعية ممتازة أو جيدة. أظهرت نسبة حمل مماثلة لتلك المستحصل عليها من الأجنة السليمة ذات النوعية المماثلة.

إن نسبة الحمل المتوقعة من أنصاف الأجنة المفردة المغروسة لا جراحياً فى إناث بقرية مفردة مستلمة عادة ما تتراوح بين 45 - 65 %، أما العامل المهم الآخر فى نسبة الحمل المثلئ فهو طور النمو الجنيني، حيث وجد أن نسبة الحمل لأنصاف الأجنة الناتجة عن طور التويته المبكر كان أوطأ بصورة معنوية عنها فى نسبة الحمل الناتجة عن أنصاف الأجنة الناتجة عن طور الكيسه الأريمية المبكر ولا يملك الغطاء الواقى للبيضة (ZP) تأثيراً محسوساً على بقائية أنصاف الأجنة داخل الحى، وإن نجاحاً مماثلاً قد تم تحقيقه سواء وضعت أنصاف الأجنة فى غطاء واقى أصلي Original ZP أو غريب Foreign Zp.

على الرغم من وجود إشارات أخرى نحو أفضلية الأول ونسبة 74 % عنه فى الغطاء الواقى الغرب أو البديل، إن أعلى نسبة للتوأمة والحمل، تم الحصول عليها عندما نقلت أنصاف الأجنة بصورة أزواج Pairs بدلاً من نقلها بصورة مفردة Single إلى الإناث المستلمة، وكان معدل الحمل الذى تم تسجيله مماثلاً عند نقل أزواج أنصاف الأجنة إلى نفس البوق الرحمى Uterine horn ، أو عندما ينقل أحد أنصاف الأجنة إلى كل واحد من الأبواق الرحمية للماشية المستلمة، وبينت الدراسات أن بقائية غير متوقعة

في الرحم تكون مصاحبة للأجنة البقرية المشطورة إلى أرباع ٠ من أجنة قبل مرحلة التضام أو الدمج Pre compaction أو بعدها Post Compaction مما يشير إلى أن أرباع الأجنة هي أقل قدرة على إنتاج إشارة كافية من التغذية اللوتينية Luteotrophic داخل الرحم لمنع تحوّل الأصفرى Luteal Regression في الإناث المستلمة، وقد تعود البقائية المنخفضة لهذه الأرباع إلى افتقادها لخلايا جنينية كافية في كتلة خلاياها الداخلية (ICM) لتكوين أجنة حية.

3 - 1 - 6 نقل كتلة الخلايا الداخلية:

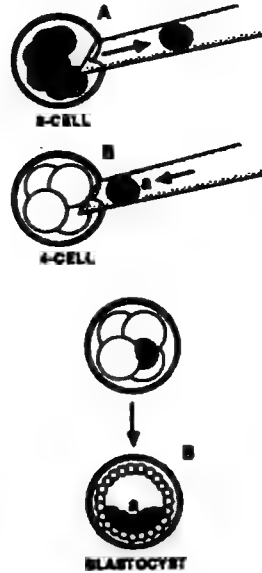
تعد القدرة على نقل الأجنة بين الأنواع المتقاربة أحد الأساليب المهمة لإنقاذ الأنواع المعرضة للانقراض، وفي عقد الثمانينيات تمكن العلماء وبنجاح في نقل الأجنة من أحد الأنواع النادرة Exotic Species إلى نوع آخر بديل سائد Abundant Surrogate Species وفي عام 1984 نجح الباحث دريسير Dresser في عملية النقل الجنيني من حيوان بقر الوحش Bongo antelope واسمه العلمي Tragelaphus euryceros إلى حيوان العلند الأفريقي (ظبي أفريقي ضخّم) African eland واسمه العلمي Tragelaphus oryx وبرهنت هذه التقنية على إمكانية تحقيق زيادة سريعة في الحيوانات النادرة كواهب للأجنة وبالاكتفاء على الحيوانات الأكثر شيوعاً والعائد لذات الجنس أو ذات الصلة القريبة كمستلمات لهذه الأجنة، وفي حالة الحمل وذلك لوجود اختلافات في المورفولوجيا المشيمية أو وجود مشاكل في التوافق المناعي، وفي مثل هذه الحالات، يمكن استخدام تقنية إعادة بناء وتكوين الأجنة بالجراحة المجهرية Microsurgical Embryo Reconstruction Technique.

يعود تاريخ تطوير تقنية نقل الخلايا الجنينية بالجراحة المجهرية لحيوانات المزرعة إلى عام 1980، وتعتمد التقنية على فصل القسيمات الأرومية Blastomere ونقل الخلايا إلى جنين غير متواتر Asynchronous embryo يعود لذات النوع، وإذا ما تم ذلك بنجاح باستخدام الحقن المجهرى Microinjection أو الجراحة المجهرية فإن الجنين المتبرع أو الواهب المشتق من واحد أو أكثر من القسيمات الأرومية النامية سوف تتطور طبيعياً في الرحم عندما تنقل إلى أنثى مستلمة.

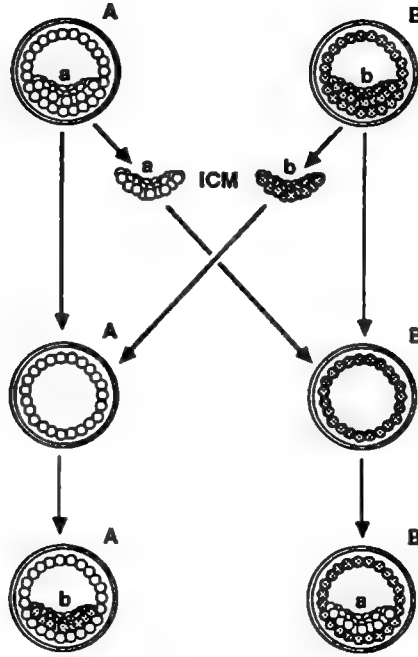
إن روعة هذه التقنية للتطويع المجهري تتمثل بامتلاك الأجنة المحولة جراحياً لأغشية -مية من طبقة التروفوإكتوديرم للجنين الثاني أما الجنين ذاته فسوف ينمو من كتلة الخلايا -جنين الأول (الشكل 3 - 3) وهذا يسمح بإعادة أو تشكيل الجنين لتوضع في إناث مستلمة لجنين ثاني من النمط الاستيلادي breed type أو لنوع آخر .

ومن المناهج التقنية الأخرى هي التقنية التي تتضمن إزالة كتلة الخلايا الداخلية من جنين في مرحلة الكيس الأرومي للنوع الواهب ووضع هذه الكتلة الخلوية في كيس أريمي -نوع المستلم والذي أزيلت كتلته الخلوية الداخلية (الشكل 3 - 4) وبذلك ستمتلك الأجنة -نقولة إليها كتلة الخلايا الداخلية أنسجة مشيمية ذات خواص متطابقة لتلك الموجودة في -حيوان المستلم، والجنين المتطور ضمن الأمينون amnion سيكون من النوع الواهب، حيث أنه يكون بالأصل من كتلة الخلايا الداخلية المغروسة .

FROM 8-CELL TO 4-CELL EMBRYO



الشكل (3 - 3) : أسلوب إعادة تكوين وبناء الجنين باستخدام النقل غير المتواقت للقسيم الأرومي من جنين ذو 8 خلايا إلى جنين ذو 4 خلايا، والنمو الأكثر أهمية للقسيم الأرومي يعود لمساهمة كتلة الخلايا الداخلية .



الشكل (3 - 4) : أسلوب نقل كتلة الخلايا الداخلية (ICM)، حيث يتم نقل كتلتين من هذه الخلايا (a , b) من جنينين مختلفين في طور الكيسة الأريمية (A , B)، حيث يتم تبادل كتلة من الخلايا بين الجنينين باستخدام تقنيات الجراحة المجهرية.

إن المثال الجيد على هذه الحالة هو استخدام الخراف والماعز كإناث متبرعة بالأجنة، فحين تنقل أجنة الخراف إلى أنثى ماعز مستلمة أو العكس أي حينما ينقل جنين ماعز إلى أنثى خروف (نعجة) مستلمة، فإن الأجنة المغروسة لا تتطور إلى نهاية الحمل، ولكن في حالة إزالة (ICM) لجنين الخراف بالجراحة المجهرية وتوضع في جنين الماعز المزالة منها الـ (ICM) الخاص بها فإن الجنين المعاد تشكيله يمكن غرسه ونقله إلى أنثى ماعز مستلمة ويؤدي ذلك إلى زيادة احتمالية الحصول على ذرية وليدة وذلك لأن الأغشية المشيمية لهذا الجنين سوف تشتق من جنين الماعز الأصلي، والنتيجة النهائية ستكون نقلاً بين الأنواع لجنينين، حيث تلد أنثى الماعز حاملان والنعاج سوف تلد ذرية من الماعز، وبذلك يمكن تطبيق هذه التقنية في إنقاذ الأنواع الأخرى المهددة بالانقراض.

3 - 1 - 7 نقل الأجنة Embryo transfer :

يتم في هذه التقنية عزل البويض المخصبة من الحيوانات الواهبة (Donores) وزرعها في الحيوانات المستقبلة (Recipient) لكي تحضن فيها لحين الولادة بعد أن يتم استخدام نهرمونات لغرض إيصال الحيوانات الواهبة والمستقبلة إلى مستوى واحد من الدورة تكاثرية وتساهم هذه التقنية بشكل فعال في زيادة الإنتاجية كما ونوعاً، ولغرض حصول على عدة أجنة من حيوان واهب واحد، حيث يمكن نقل بعضها إلى الحيوان مستقبل والباقي يمكن حفظه باستخدام التجميد، ولتجميد الأجنة العديد من الفوائد والتي تشمل السيطرة والحد من حالات انخفاض الخصوبة ورخص كلفة نقل الأجنة، ويمكن أن تتم عملية نقل الأجنة بإجراء عملية جراحية أو باستخدام الطريقة غير الجراحية عن طريق غسل الجهاز التناسلي للأبقار والحصول على الأجنة ومن ثم نقلها إلى الحيوانات المستقبلة.

وتشكل مبايض الحيوانات الذبوحة في المجازر مصدراً رخيصاً لتجهيز البويضات وبكميات كبيرة ومصدراً لإجراء البحوث بعد إنضاجها وإخصابها في المختبر لاستخدامها في مشاريع نقل الأجنة وخاصة لغرض إنتاج التوائم في أبقار اللحم، وفي عام 1983 تم إنتاج أكثر من 60.000 حيوان بطريقة نقل الأجنة في الولايات المتحدة وحدها. ولغرض المحافظة على الأجنة في عمليات النقل بعيد الأمد ولمسافات طويلة فيمكن نقل هذه الأجنة داخل أرحام حيوانات حية أخرى فقد أجريت اختبارات تم فيها نقل قطيع كامل من أجنة الماشية عبر المحيط الأطلسي داخل رحم أرنب حي «الأرنب هو الحيوان أو المضيف المثالي» وعند الوصول، تم استخراج هذه الأجنة من رحم أرنب وغرست بنجاح في أمهات «أبقار» بدائل والتي ولدتها فيما بعد عجولاً طبيعية وذات نمو، ونشاط جنسي طبيعي.

وكان قد تم في أواخر عام 1978 تجميد عدد من أجنة الفئران وكان بعض هذه الأجنة محفوظاً بدرجة حرارة 452 م° تحت الصفر، ثم أذيب عنها الجليد وغرست بنجاح في أمهات بدائل.

3 - 2 تقنيات التثقيب والاندماج الكهربائي :

تعد هذه التقنية جزءاً من التقنيات الحديثة التي تعود إلى علم مستقل يعرف باسم الكيمياء الكهربائية الحيوية Bioelectro chemistry أو كيمياء الفيزياء الحيوية Biophysiological chemistry وتشمل التطبيقات المتقدمة لهذه المجالات العلمية .

1 - التثقيب الكهربائي Electroporation : وفيه تستخدم النبضات الكهربائية لتكوين ثقب في الأغشية الحيوية يمكن من خلالها إدخال شدة الدنا إلى داخل الخلايا وإجراء التحول الكهربائي Electrotransformation .

2 - التحييد الكهربائي Electrocutting : وفيه يتم استخدام التيار الكهربائي للتخلص من البلازميدات البكتيرية .

3 - التحرر الكهربائي لمحتويات الخلية Electorelease : وفيه يتم استخدام التيار الكهربائي في عملية تحرير محتويات الخلية إلى الخارج عبر الأغشية الحيوية .

4 - التنبيغ (الاستيعاب الاندماجي) الكهربائي Electrotransfection : وفيه يستخدم التيار الكهربائي في تنبيغ الخلايا كهربائياً .

5 - التحفيز الكهربائي Electrostimulation : وفيه يستخدم التيار الكهربائي في تحفيز نمو وتضاعف الخلايا .

6 - الإدغام الكهربائي Electroinsertion : وفيه يتم إدغام البروتينات داخل أغشية الخلايا كهربائياً .

7 - الاندماج الكهربائي Electrofusion : وفيه يتم استخدام التيار الكهربائي في تحقيق الاندماج بين خليتين كاستخدامها في تحقيق الاندماج الكهربائي بين الخلية الجسمية والبيضة منزوعة النواة .

تم إنتاج أنواع مختلفة من الأجهزة المناسبة لإجراء عملية التثقيب الكهربائي مثل جهاز النبض الجيني Gene Pulser المنتج من شركة Bio - RAD الشكل (3 - 5) .

تؤثر العديد من العوامل على نجاح عملية التثقيب الكهربائي ومنها الدارء Buffer تستخدم في عملية التثقيب والاندماج لأن العملية تؤدي إلى تكوين حرارة عالية والتي تؤثر بدورها على بقاءة الخلايا.

ومن ميزات الدوارء المستخدمة هي امتلاكها لقوة أيونية ضعيفة , Na^+ , NH_4^+ , Mg^{++} ، حيث إن الأيونات تؤدي إلى زيادة التوصيل الكهربائي إلى الحد الأعلى الذي لا يمكن أن تتحملة الخلايا الحية وعادة ما تحتوي الدوارء على 10% من الكليسرول لتوفير حماية لهذه الخلايا.

تقاس قوة الحقل الكهربائي Field Strength بالفولت/ سنتيمتر ، والأخيرة تمثل قياس 'مساحة أو الفجوة gap بين الإلكترودات في الحاوية (الكيفيت).

تتباين مقدار قوة الحقل الكهربائي المستخدمة اعتماداً على نوع الخلايا الحية (الجدول 3 - 1) ففي البكتريا تتراوح بين 6.25 - 16 وقد تصل إلى 25 كيلو فولت/ سم (لا تظهر القيمة الأخيرة في الجدول) وبطول نبضة لحد 5 ملي ثانية (milliseconds) أي 5 بالألف من الثانية .

أما خلايا اللبائن فتتطلب فولتية أوطأ بكثير وعادة ما تتراوح لأغراض التحول الوراثي من 350 - 650 فولت/ سنتيمتر ولمدة زمنية تتراوح ما بين 5 - 25 ملي ثانية وحسب نوع الخلية .

ومن العوامل المؤثرة الأخرى هي درجة الحرارة والتي يجب أن تكون واطئة من 0 - 4 م° . إذ تهبط كفاءة عملية التحول بحدود 100 ضعف إذا ما أجريت في درجة حرارة الغرفة .

ومن العوامل المؤثرة الحرجة هي حيث يجب أن تكون كثافة الخلايا أقل بكثير من 10×2^6 خلية/ مل في حالة إجراء تجارب التحول الكهربائي وعلى النقيض من ذلك في حالة إجراء تجارب الاندماج الكهربائي والتي تتطلب كثافة أعلى بكثير من الرقم المذكور .



الشكل (3 - 5): جهاز التشقيب الكهربائي المعروف بالنافض الجيني Gene Pulser مع توابعه وهي باسطة (مادقة) السعة Capacitance Extender الذي يستخدم مع الخلايا حقيقية النواة ومنظم النبضات Pulse Controller الذي يستخدم عادة مع البكتريا وبقية الخلايا بدائية النواة.

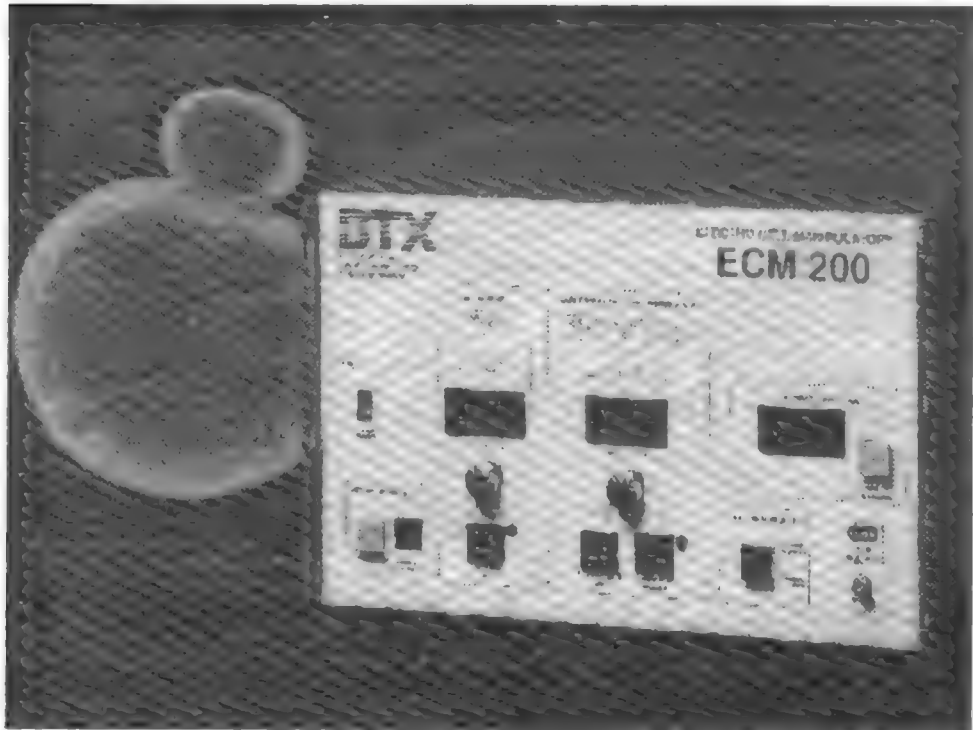
Bacteria	Field strength	Pulse Length
<u>Agrobacterium tumefaciens</u>	12.5 kV / cm	- 5 ms
<u>Bacillus subtilis</u>	16 kV / cm	- 5 ms
<u>Lactobacillus acidophilus</u>	6.25 kV / cm	- 5 ms
<u>Pseudomonas Putida</u>	6.2 kV / cm	- 5 ms
<u>Staphylococcus aureus</u>	6.25 kV / cm	- 5 ms
<u>Streptococcus</u> spp.	6.25 kV / cm	- 5 ms
<u>Mammalian cells</u>		
Primary bone marrow cells	625 - 750 V / cm	7 - 11 ms
Hela , cos , 3T3	500 - 750 V / m	5 - 10 ms
<u>Fungi</u>		
<u>T. harzianum</u>	2.8 kV / cm	20 ms
<u>Dictyostelium</u> sp.	2.5 kV / cm	0.6 ms
<u>Plant protoplast</u>		
Tobacco	624 - 875 V / cm	20 ms
Maize	500 V / cm	2 - 4 ms
From (Invitrogen Manual , 1992)		

الجدول (3 - 1): قوة الحقل الكهربائي ومدة النبضة المستخدمة في إجراء عملية التثقيب الكهربائي لكائنات حية وخلايا مختلفة .

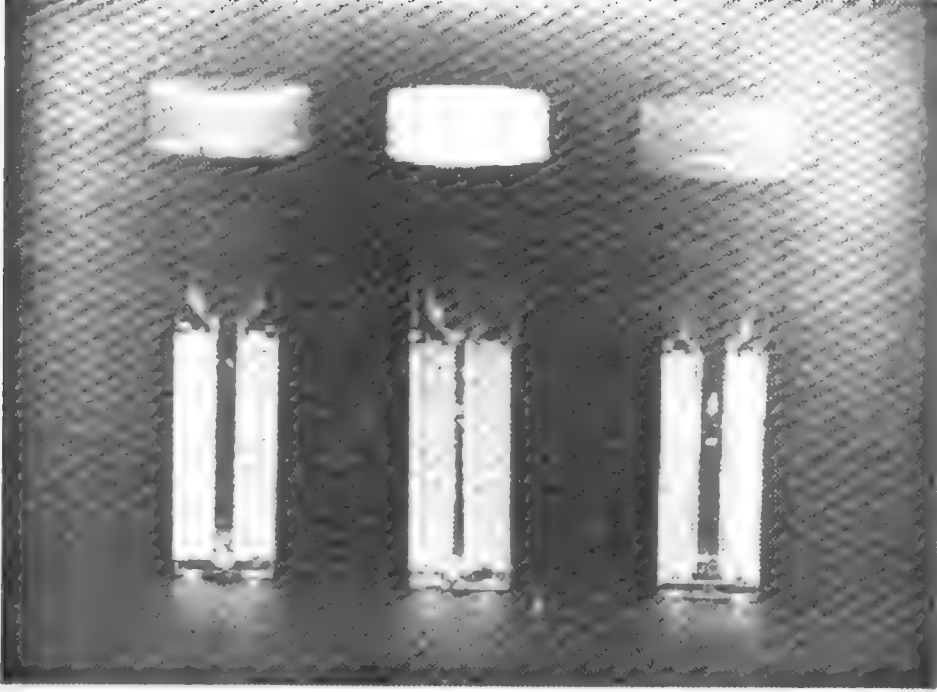
تتماز عملية الاندماج الكهربائي بعدم حاجتها إلى عوامل مساعدة كيميائية كاستخدام الكلايكلول متعدد الأثيلين (PEG) ، تتوفر حالياً أجهزة متعددة يمكن استخدامها في التثقيب الكهربائي والاندماج الكهربائي على حد سواء في حين يمكن استخدام بعضها في التقنية الأخيرة حسب (الشكل 3 - 6 - A , B) تستخدم تقنية الاندماج في عدد كبير من التطبيقات وتشمل :

- 1 - إنتاج الحيوانات عبر الوراثة Transgenic Animals.
- 2 - الغرس النووي Nuclear Transplants.
- 3 - التكاثر العذري Parthenogenesis.
- 4 - الإخصاب المخبري In Vitro Fertilization.
- 5 - إنتاج هجائن بشرية Human Hybrid.
- 6 - إنتاج هجائن فأرية / بشرية Human / Mouse Hybridomas.
- 7 - بحوث اندماج الأغشية Membrane Fusion Research.
- 8 - إنتاج هجائن (نباتية - خمائر - فطريات - طحالب).

يتضح مما سبق أهمية تقنية الاندماج الكهربائي والتي استخدمت بكفاءة عالية في استئصال النعجة «دوللي» والتي سوف يتم التطرق إليها بالتفصيل في الفصل السابع.



الشكل (3 - 6 - A): جهاز الاندماج الكهربائي من إنتاج شركة (DTX) نوع ECM 200.



الشكل (3 - 6 - B): حاويات خاصة للشقيب والاندماج الكهربائي يتم وضع عالق البكتريا أو الخلايا في ظروف تعقيم داخل هذه الحاويات الحاوية على أقطاب كهربائية (إلكتروودات) في قعر الحاويات والموجودة على مسافة محددة ومقاسة بدقة .

الفصل الرابع

هندسة التكاثر

و

آفاق التحوير الجيني

4 - هندسة التكاثر وآفاقها

4 - 1 - هندسة الجينات في خلايا واجنة الحيوانات اللبونة:

تشكل هندسة الجينات والتحوير الجيني للخلايا اللبونة مع التقنيات المتقدمة للاستئصال أحد أهم الأفكار الواعدة على صعيد التطبيق العملي لإنتاج البروتينات العلاجية وفي تحسين الذخيرة الوراثية للحيوانات الاقتصادية. على الرغم من أن الحقائق العلمية المعروفة تشير إلى أنه وباستثناء القليل من الحيوانات الوطئة مثل بعض الديدان، فإنه لا يمكن لأي نسيج حيواني متزوع من جسم الكائن الحي أن ينمو لتكوين كائن حي جديد وبطريقة الإخلاف أو بالطريقة التي يمكن فيها لفرع من أفرع أشجار الفاكهة أن ينمو ويكون شجرة أو شجيرات جديدة.

وقبل استنباط التقنيات المتقدمة في هندسة الجينات، كانت التقنيات التقليدية كتهجين الخلايا الجسمية أو الاندماج باستخدام الكلايكول متعدد الأثيلين Polyethylene glycol أو الاندماج المحفز بفايروس السنداى Sendai Virus هي التقنيات الوحيدة المعول عليها في نقل الجينات والتي اعتمدت أساساً على تبادل هذه الجينات من خلال اتحاد الأنوية لصفى الخلايا المندمجة أو المتحدة.

وفي العام 1976 نجح العالم جاينش (Gaenisch) ولأول مرة في إيلاج جينات غريبة (ذات مصدر وراثي مختلف) في خلايا الفأر وظهورها لاحقاً في أجيالها، حيث تمكن هذا العالم من إصابة المرحلة الجنينية (طور التوتية) في الفئران بفايروس سرطان الدم (M - MUIV) وغرس الأجنة المصابة في أمهات حاضنات Foster mothers، وبينت النتائج أن حوالي 10 - 40% من البالغات أصيبت بالمرض بعد عدة أشهر، كذلك أظهرت النتائج أن المرض الذي يظهر في الفئران عند نقل الفايروس يكون نتيجة لاندغام وتكامل المادة الوراثية للفايروس في خلايا الجنين كافة، ولم تقتصر على خلايا الطحال والثايموس وأن تزاوج الذكور البالغة الناتجة من الأجنة التي تكامل واتحد الفايروس في خلاياها الجرثومية الأولية التكاثرية مع إناث طبيعية أنتج جيلاً من الذكور التي نقلت الفايروس إلى 50% أفراد الجيل التالي. وتجنباً لمشاكل انتقال الفايروس إلى الرحم، تم

التركيز على دراسة الذكور فقط ، حيث أظهرت الذكور الناتجة من أجنة مصابة نقلاً متغيراً متدنياً للفيروسات ، وأظهرت التجارب حقيقة مذهشة تمثلت باحتواء كل الخلايا الجسمية العائدة للجيل الثاني من الذكور على الدنا الفيروسي وفي 50% من أفراد الجيل انتقل هذا الدنا بصورة سائدة؛

وقد نجح هذا الباحث الفذ في إثبات إمكانية اندغام وتكامل الدنا الغريبة Foreign DNA وبثبات ضمن موروث Genome خلايا الحيوانات اللبونة ولأول مرة، وبذلك مهد هذا الباحث لإجراء العديد من التجارب عبر الوراثة Transgenic ودراسة التخصص الخلوي خلال النمو الجنيني من خلال مراقبة مصير الجينات المنقولة عبر خلايا الخط الجرثومي Germ Cell line.

وفي عام 1960 نجح العالمان «برنستر ومنتز» Brinster & Mintz في إجراء تجارب ريادية على بيوض وأجنة الفئران والتي تعد مثالية للاستخدام في تجارب التخصص العضوي ، حيث يمكن تحفيز تكوين البيوض وإنتاج عدد من البيوض في مراحل مختلفة من تطورها في قناة البيض في الفئران وتنميتها حين بلوغها مرحلة الخلية الأرومية Blas tocyte وعلى الرغم من سهولة التعامل والتطويع المجهرى لبيوض وأجنة الفئران فإن التلقيح المخبري للبيوض الفأرية يكون أكثر صعوبة عنه في خلايا البويضات البشرية .

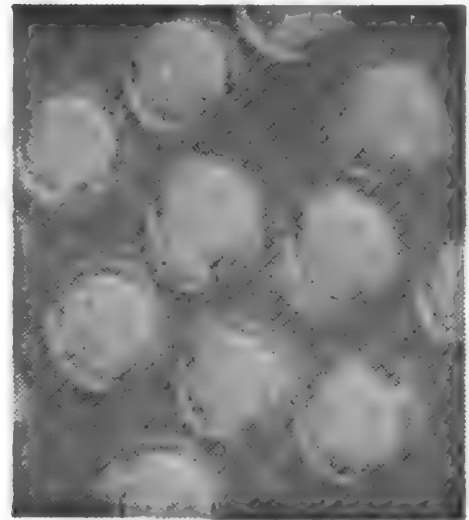
تتم عملية التطويع المجهرى للبيوض المخصبة باستخدام الماصة المجهرية ، حيث يمكن إزالة ورفع هذه البيوض المخصبة وإعادتها مرة أخرى إلى رحم الأمهات الحاضنات وحالما تلتصق هذه البيوض بجدار الرحم تبدأ في النمو والتطور ويمكن الحصول على نسب عالية من النجاح تبلغ بحدود 80 - 90 % من ولادات الفئران الطبيعية .

4 - 1 - 1 الحقن المجهرى Microinjection :

استخدمت تقنية الحقن المجهرى (Microinjection) في إنتاج الفئران عبر الوراثة لأول مرة في عام 1980 ، ومنذ ذلك الحين فإن الآلاف من الفئران عبر الوراثة «المحورة وراثياً» تم إنتاجها واستخدامها في علم أحياء اللبائن وبحوث السرطان والهندسة الوراثية .

وتقنية الحقن المجهرى من الأساليب المهمة في إيلاج قطعة نقية من الدنا الغريبة

تمثلة للجنين المطلوب إلى داخل نواة الخلية، حيث يتمركز موروث الخلية على أمل أن تكامل القطعة المحقونة مع هذا الموروث. وتوفر هذه التقنية إمكانية حقن الدنا الجديد في لأجنة بعد الإخصاب بفترة قصيرة جداً (الشكل 4 - 1) وباستخدام إبرة مجهرية خاصة لا يزيد قطرها الخارجي عن 2 مايكروميتر وغالباً ما يتم حقن 2 بيكوليتراً (1 لتر = 10^{12} بيكوليتراً) من المحلول الحاوي على الدنا الغريبة في النوى الأولية ومن دون أن تحدث الضرر للجنين، وعادة ما تصنع هذه الإبر المجهرية من شعيرات زجاجية (Glass Capil laries) وباستخدام التسخين وشد مسيطر عليها (Controlled heating & tension)) يمكن إيلاج الإبرة الدقيقة داخل الجنين ومتابعة عملية الحقن بجهاز المطواع المجهري (Microma nipulator) وهو مجهر ضوئي مزود بتقنية التحكم والتطويع المجهري (الشكل 4 - 2) حيث يمكن رؤية الجنين ومحتوياته الداخلية بوضوح وتستخدم الماصة الداعمة لتثبيت وشفط الخلية الجنينية ومنع حركتها وتقييدها لمنع حصول الضرر الناجم عن إيلاج إبرة الحقن المجهري. (الشكل 4 - 3).



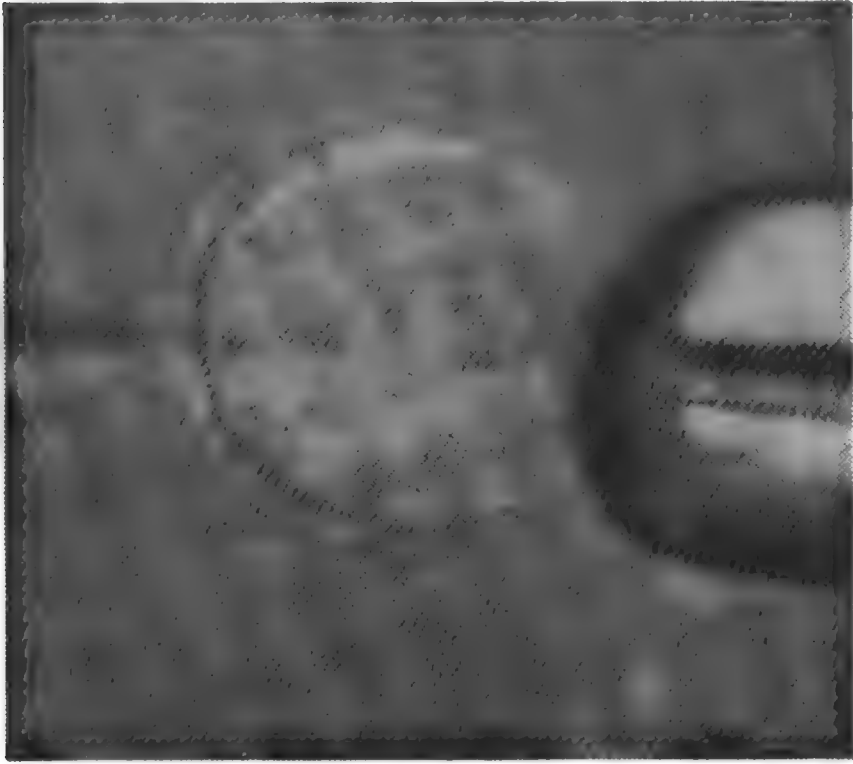
أ - الشكل (4 - 1) : أجنة في أطوارها المبكرة الأولى.

ب - الشكل (4 - 2) : جهاز المطواع المجهري المؤلف من المجهر المعكوس وأداة للتحكم في الحقن المجهري للبيوض.

وتشمل الخطوات العملية لإنتاج فئران عبر وراثية، عملية هندسة الدنا الغريبة من خلال غرس الجين المطلوب تحت سيطرة الحفاز (Promoter) والجين المنظم وغرس القطعة المدمجة في ناقل استنسال (Cloning Vector) كالبلازميد ومضاعفة وتضخيم الدنا الغريب داخل البكتريا، يتم بعدها استخلاص الجينات المضخمة في النواقل وهضمها بأحد أنزيمات التقيد ذات الخصوصية النوعية وتنقيتها ومن ثم تخفيف النماذج إلى الدرجة المناسبة لإجراء عملية الحقن المجهرى ولغرض الحصول على أجنة للتطويع الوراثي تعامل الإناث العذارى بالهرمونات لغرض تنظيم توقيت (Synchronization) دورتها التكاثرية ولزيادة عدد البويضات المطروحة بحيث تتحول هذه الإناث إلى إناث فائقة التبويض (Superovulation) والتي تحوي على 10 - 20 بويضة في كل مبيض وبعدها 20 - 40 جنين لكل أنثى. وبعد الإخصاب بحدود 8 - 12 ساعة تصبح الأنوية الأولية ظاهرة للعيان وذات تراكيب كروية متميزة يمكن تمييزها والتعرف عليها بسهولة باستخدام المجهر الضوئي وتحت قوة تكبير تبلغ (100X - 200X) وغالباً ما تستخدم النواة الأولية الذكرية «المشتقة من الحيمن» لأغراض الحقن المجهرى وذلك لكبر حجمها قياساً إلى النواة الأولية الثانوية (المشتقة من البيضة) وهذا يعود لكون نضوج الأنوية في الحيامن يحدث قبل نضوج السايטوبلازم في حين يحدث نضوج النواة في البيضة بصورة مترادفة ومتوافقة مع نضوج السايטوبلازم. وعادة ما يتم حقن ما بين 50 - 500 نسخة من شدف الدنا المهندس وراثياً في النواة الذكرية الأولية، حيث يستدل على نجاح عملية الحقن بانتفاخ النواة الأولية المحقونة وبعد اندماج النواتين الأوليتين يتكون الزايكوت الحاوي على العدد الكامل من الكروموسومات والذي يبدأ بالانقسام لتكوين الجنين، ولا يمكن لجميع الأجنة (البويض المخصبة) أن تنجو من الضرر الميكانيكي نتيجة غرس إبر الحقن المجهرى فيها ولكن بنسباً جيدة تبلغ بحدود 60 - 80 % منها يمكنها البقاء بصورة سليمة.

وتتم جميع عمليات التطويع في ظروف تعقيمية مشددة (الشكل 4 - 4) ينمو الجنين في المختبر إلى أن يصل إلى مرحلة التوتية ويعاد زرع الأجنة المحورة وراثياً باستخدام الجراحة المجهرية (Microsurgery) في قناة البيض لإناث الفئران المستلمة ذات الحمل الزائف (Pseudopregnant) والتي يتم تهيتها هرمونياً وبلوغها الحالة الهرمونية الملانمة

محمل وتقبل الأجنة المنقولة من خلال إجراء التزاوج بينها وبين ذكور عقيمة مقطوعة قناة الدافقة للحيامن (Vasectomized) وتسمى الإناث المستلمات للأجنة المحورة -أمهات المرضعات (Foster Mothers) ويمكن للأجنة المحقونة بعد إتمام عملية الزرع أن تحقق نمواً جنينياً طبيعياً ولحين الولادة وفي معظم الحالات يتم ترك الفئران الصغار تولودة حديثاً مع أمهاتها المرضعات حتى يصبح عمرها ثلاث أسابيع وهو العمر اللازم لنظم هذه الصغار .



الشكل (4 - 3) : تقنية الحقن المجهري للبيوض

إن الدنا المحقون إذا ما تكامل مع الموروث بثبات فإنه يتضاعف مع بقية الدنا الكروموسومي في كل دورة إنقسام خلوي وبالتالي يتوزع هذا الدنا ويتشر إلى الخلايا المنوية أثناء النمو الجنيني وعلى العكس من ذلك إذا لم يتكامل هذا الدنا مع الموروث فإنه سرعان ما يتخفف (Diluted) بسرعة أثناء التطور الجنيني ويفقد داخل خلايا الفئران

الحديثة الولادة، ولغرض التحري والكشف عن الفترات المتحولة وراثياً يتم عزل ومسح دنا الموروث لهذه الفترات وذلك بإزالة قطعة صغيرة من ذيول الفترات الوليدة بعمر 3 - 4 أسابيع واستخلاص دنا الموروث من خلايا الذيل وتضخيم قطع الدنا الغريب المحقون والمتكاملة مع المورث باستخدام تقنية التفاعل لأنزيم بلمرة الدنا (PCR) أو التحري عن الدنا المحقون مجهرياً باستخدام طرق التهجين التقليدية (Hybridization Techniques) كتهجين وصمة سودرن (Southern blot) .

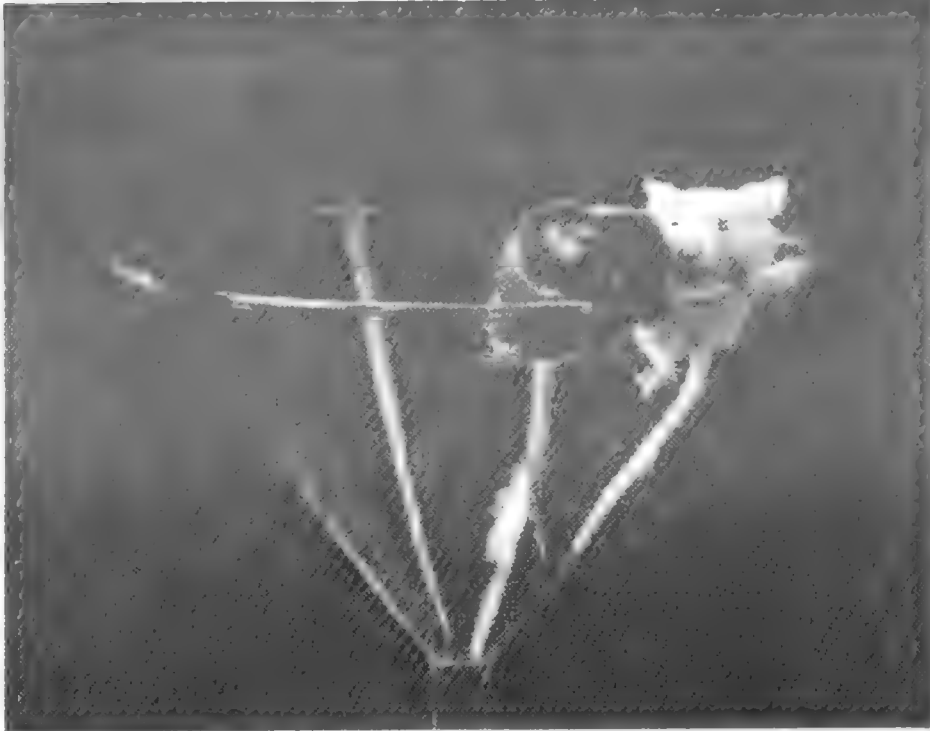


الشكل (4 - 4) : تستخدم ظروف تعقيم مشددة في عمليات نقل الأجنة وباستخدام حاويات عزل وكابينات معقمة.

وبينت التجارب وبصورة مشيرة للدهشة أن (15 - 30 %) وفي مصادر أخرى (3 - 40 %) من الفترات الحديثة الولادة تحتوي عادة على الدنا الغريب متكاملًا ضمن موروثاتها، مما يدل على اندماج وتكامل الدنا الغريبة في أحد الكروموسومات (تحتوي خلايا الفأر على العدد الشائعي للعادي للكروموسومات والبالغ 40 كروموسوماً) أثناء

مراحل المبكرة من تطور الأجنة . كذلك أظهرت التجارب وجود الدنا الغريبة المحقونة في جميع خلايا الفئران عبر الوراثة (الشكل 4 - 5)، مما يثبت انتقالها خلال الخط الجرثومي وفي معظم الفئران عبر الوراثة فإن هذا الدنا يتكامل في موضع واحد فقط على الموروث ولكن بنسخ متعددة تتراوح بين (1 - 1000 نسخة) والتي غالباً ما ترتبط في ترتيب مترادف في موقع الاندغام المفرد مع وجود اختلاف في عدد النسخ المندمجة في الكروموسوم بين فئران وآخر .

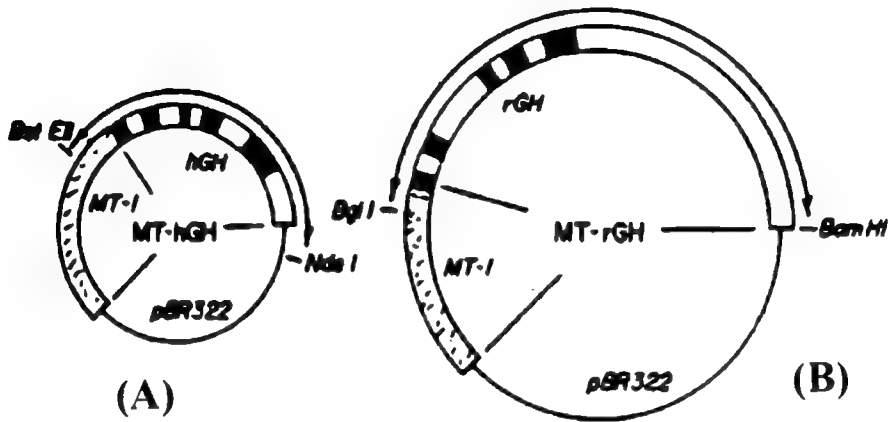
وأظهرت التجارب أيضاً أن السلالات الناتجة عن تزاوج الفئران عبر الوراثة قد توارثت الدنا الغريبة حسب القوانين المنديلية وأن تعبير الجينات المحقونة لا يكون متماثلاً في جميع الأفراد الناتجة، حيث اختلف مستوى تعبير هذه الجينات بين فرد وآخر .



الشكل (4 - 5): إنتاج الفئران عبر الوراثة (المتحولة) Transgenic mice باستخدام تقنية الحقن المجهري للبيوض .

4 - 1 - 2 الفأر العملاق Giant Mouse :

في العام 1982 أعلنت الصحف عن ولادة الفأر الجبار «مايتي ماوس» وآثار هذا الخبر ضجة كبيرة وتداعيات في الأوساط العلمية والاجتماعية، وكان الفأر العملاق تنويجا لجهود ومحاولات العلماء لنقل صفة من أحد أنواع اللبائن إلى نوع آخر وتحقق ذلك في عام 1982 إذ استخدم ريتشارد بالميتير (Richard Palmiter) ورالف برنستير Ralph Brinster وزملاؤهما تقنيات الهندسة الوراثية في إنتاج الفأر العملاق، إذ قامو بربط شذفة من الدنا المشفر لهرمون النمو البشري وهرمون النمو الجرذي كل على حدة إلى تعاقب (تتالي) المحضض أو الحفاز لجين الميتالوثايونين "MT" - 1 Metallothionine والذي يشفر لبروتين صغير ينتج بوفرة في أنسجة الكبد والكلية، وبعبارة أخرى فقد صنعوا جينا خيمريا «Chimeric» جديدا عرف بجين (MT - GH) وتم ربط شذفة الدنا المدمجة لهذا الجين مع ناقل الاستئصال البلازميدي pBR 322 (الشكل 4 - 6).



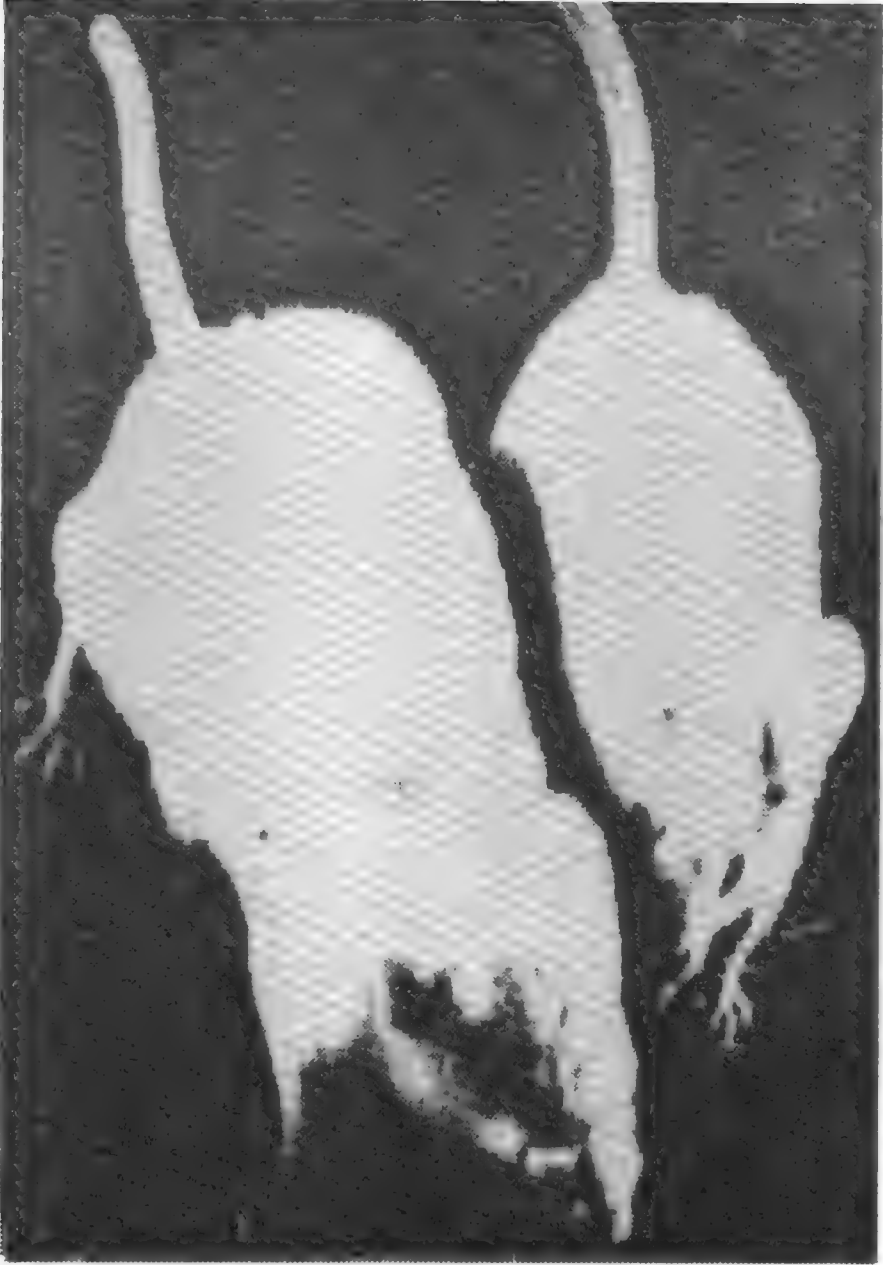
الشكل (4 - 6): ناقل الاستئصال البلازميدي المتالي pBR 322 الحاوي على حفاز جين (MT - 1) الميتالوثايونين المدمج مع جين هرمون النمو البشري (hGH) (الشكل -A-) : جين هرمون النمو للجرذي (rGH) (الشكل -B -). حيث تظهر الاكسونات بصورة داخنة وتختالفها الاكسونات (بيضا).

ويعبر جين هرمون النمو الداخلي المنشأ (Endogenous) في الحالة الاعتيادية في نخامى (Pituitary) ويفرز بعد ذلك إلى مجرى الدم ليقوم بأداء وظيفته في تنظيم النمو بعد الولادة (Postnatal growth)، في حين يعبر جين الميتالوثايونين عن نفسه تفاضلياً في خلايا الكبد والكلية، حيث يعمل بروتين الـ MT على حماية الخلية من المستويات السمية لمعادن الثقيلة.

وتم تصميم الجين الخيمري (MT - GH) بحيث يمكن حفاز جين (MT) كل من نرنا المرسال (m - RNA) لهرمون النمو والبروتين من التخليق من قبل خلايا الكبد، وتم حقن الجين المدمج في 170 بيضة من بيوض الفأر المخصبة حديثاً وزرعت الأجنة الناتجة في أرحام الأمهات المرضعات (6 من إناث الفئران المهيأة هرمونياً).

وبعد ثلاثة أسابيع وهي فترة الحمل الطبيعية ولد 21 فأراً صغيراً ولوحظ وجود الجين الغريب في سبعة فئران منها واتضح بعد أيام أن بعضاً من هذه الفئران قد بدأ ينمو بقدر مرتين أو ثلاث مرات أكبر من مثيلاتها الأخريات - وأظهرت ست من الفئران السبعة التي احتوت الجينات الموجلة نمواً يتراوح بين (20 - 80 %) أكثر من البقية، أما في الفأر السابع فإن الجين الخيمري سبب ولم يعبر عن نفسه.

ولوحظ احتواء الفئران العملاقة على عدد كبير من نسخ الجين الغريب 20 - 40 نسخة لكل خلية)، وكانت أمصالها تحتوي على تراكيز عالية جداً من هرمون النمو قد تصل إلى (100 - 800 مرة) أكثر من التركيز الطبيعي للهرمون (الشكل 4 - 7) وبما أن حفاز جين (MT) غير خاضع إلى ذات آلية التنظيم بالعوامل التي تسيطر على إنتاج مستويات هرمون النمو الاعتيادية في حفازات الجينات الداخلية المنشأ فإن فرطاً في الإنتاج (Over production) سيحدث في هذه الفئران.



الشكل (4 - 7): الفأر العملاق (فأر عبر وراثي نموذجي) مقارنة مع فأر طبيعي (يؤدي التحويل الوراثي إلى إنتاج فئران عملاقة ويزيادة في وزن الجسم تصل إلى الضعف مقارنة بالفئران غير المحورة).

إن لإنتاج الفئران عبر الوراثة أهمية في الدراسات الجزيئية للسرطان والكشف عن طفرات وكنماذج حيوانية (Animal Models) لأمراض الدم المختلفة ومنها فقر الدم المنجلي وتتيح إمكانية فهم النواحي الفسلجية المرضية وتتيح إمكانية تقييم نجاعة وفاعلية علاج الجيني وأن هذا المجال يتطور بسرعة كبيرة في الوقت الحاضر إذ يتم الإعلان عن حصول على أكثر من خمسة خطوط خلوية مختلفة من الفئران عبر الوراثة كل أسبوع .

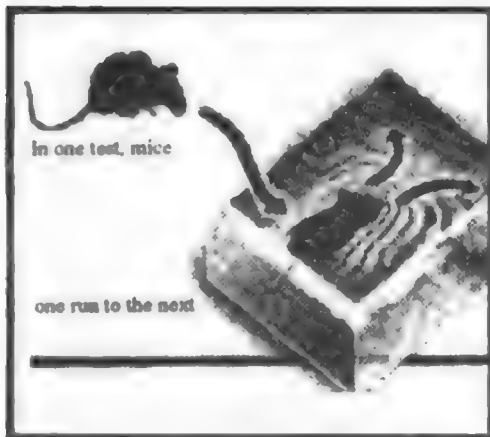
4 - 1 - 3 الهندسة التعزيزية والفئران الذكية:

يعرف مفهوم الهندسة التعزيزية أو التجميلية Enhancement Engineering بأنه تحسين نوعية الذخيرة الوراثة واكتساب صفات مرغوبة مثل لون البشرة وطول القامة ولون العيون من خلال التلاعب بالمحتوى الوراثي للبشر .

وعلى الرغم من أن التشريعات القانونية تحرم التلاعب بالجبلية الجرثومية أو خلايا الخط الجرثومي للبشر حتى لو كانت على صعيد العلاج الجيني فإن الضوابط والقوانين قد أثبتت دوماً عدم حصانتها تجاه العبث والاختراق ممن لا يؤمنون بالنواحي الأخلاقية والتزاماتها في العلوم المختلفة، حيث يمكن لهؤلاء الاستفادة مما يتوصل إليه الباحثون الآخرون في مجال الجينات البشرية وخصوصاً جينات السلوك ومنها الذكاء في تعزيز تلك الأفكار المتطرفة المتعلقة بتكوين شعوب بالغة الذكاء أو شعوباً في متهى الغباء .

ففي شهر نيسان 2000 نشر الباحث «جوي تسين» Joe Z. Tsien (الشكل 4 - 8 - A) نتائج أبحاثه المتعلقة بإنتاج الفئران الذكية أو الماكرة والفئران الغبية أو المغفلة والاختبارات التي أجراها على هذه الفئران والتي شملت قدرة الفأر على التوصل إلى المنفذ الصحيح في متاهة الماء وقدرته على التعرف على الأشكال الهندسية المختلفة (الشكل 4 - 8 - B , "C").

ويشكل إنتاج الفئران الذكية باستخدام تقنيات الهندسة الجينية الخطوة الأولى المهمة نحو استنساخ الذاكرة والمهارة والخبرة، وفي تحسين ذاكرة الإنسان، وإنتاج عقاير منشطة للذاكرة عند كبار السن ومساعدة المصابين بالاختلالات العقلية والجنون وفي إمكانية زيادة الجرعة الجينية لجينات الذكاء (IQ) والنواحي الأخرى ذات العلاقة بالهندسة التعزيزية .

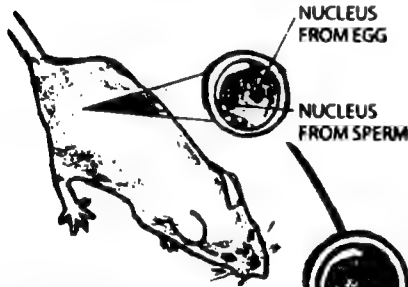


(C)

الشكل (8-4) ب : الشكل (C) باستخدام أشكال مختلفة من قطع هندسية مختلفة يمكن للفأر الذكي التمييز بينها.

HOW TO MAKE A SMART MOUSE

1 Isolate fertilized egg



2 Microinject gene encoding
NMDA receptor subunit
NR2B into either nucleus

GENE FOR NMDA
RECEPTOR
SUBUNIT NR2B
BRAIN-
SPECIFIC
ON SWITCH

3 Allow
fertilized
egg to divide

4 Introduce several
embryos produced
this way into a
female mouse

5 Birth: only some
offspring carry the
introduced gene



6 Doogie
mouse

NR2B GENE
(ACTIVE ONLY
IN BRAIN)



ويمكن الباحث «تسين» من إنتاج الفأر
نذكى أو الماكر باستخدام تقنيات الهندسة
نورائية (الشكل 4 - 9) وذلك بعزل الجين
نمسؤل عن إنتاج بروتين خاص يعرف بمستلم
نمدا NMDA والذي يتكون من وحدتين
ثانويتين، الأولى تعرف NR1B والأخرى
NR2B، تتضمن الخطوة الأولى لتقنية
الاستئصال عزل البويض المخصبة من الفأرة
وعادة تكون هذه البويض المخصبة، وحادية في
المراحل المبكرة لحدوث الإخصاب على أنوية
أولية مميزة إحداها ذكرية (من الحيمن) والأخرى
أنثوية (من خلية البيضة)، حيث يتم الحقن
المجهري للجين المشفر والمسؤل عن الوحدة
الثانوية NR2B للمستلم البروتيني NMDA
في إحدى هاتين النواتين الأوليتين (ويفضل
النواة الذكرية)، تنقسم البيضة المخصبة لعدة
مرات ثم يتم غرسها في رحم فأرة تعرف بالأم
المرضعة والتي تتم دورة الحمل إلى نهايتها.
ويتم الحصول على ذرية من الفئران التي يحتوي
بعضها على الجين الغريب المحقون والذي يمتاز
بميزة مهمة هو قدرته على التعبير في خلايا
الدماغ حصراً حيث يعمل البروتين على زيادة
قوة الاتصال بين العصبونات والتي تشكل
الأساس للتعلم والذاكرة.

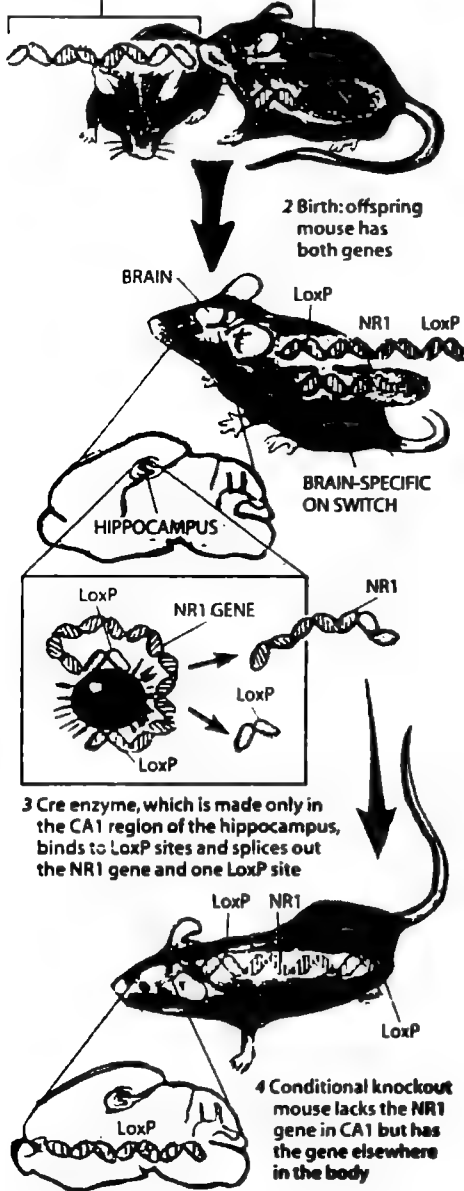
الشكل (4 - 9): إنتاج الفأر الذكي (الماكر)
باستخدام تقنيات الحقن المجهري
للبويض المخصبة للفأر

HOW TO MAKE A DUMB MOUSE

1 Breed two mice

GENE FOR NMDA
RECEPTOR SUBUNIT
NR1 FLANKED BY "CUT"
SITES CALLED LoxP

GENE FOR Cre ENZYME
ATTACHED TO AN ON
SWITCH THAT OPERATES
ONLY IN THE BRAIN



إن قدرة الإنسان على التعديل والتحويل الوراثي باستخدام التقنية الموصوفة وتطبيقها على الإنسان ممكنة من الناحية النظرية كما يرى العلماء ولكن مع الأخذ بنظر الاعتبار درجة التعقيد الكبيرة للذاكرة البشرية.

هذا ونجح الباحث في إنتاج فئران في غاية الغباء أسماها الفئران الغبية أو المغفلة، وباستخدام تقنية مختلفة (الشكل 4 - 10) وذلك بتنمية فأرين أحدهما يكون حاوياً على جين المستلم NMDA للوحدة الثانوية NR1 المعلقة بين مواضع قطع تعرف بـ (LoxP) والفأر الآخر يكون حاوياً على جين يعرف بـ (Cre) والذي يشفر لأنزيم معروف ويرتبط هذا الجين بتتابع منظم لذا يكون تعبيره مقصوراً على الدماغ دون الأعضاء والأنسجة الأخرى، وفي مرحلة لاحقة تكون الذرية الناتجة من هذه الآباء حافية على كلا الجينين في موروثها، حيث يرتبط الأنزيم Cre والذي يخلق فقط في منطقة CA1 من الحصين hippocampus مع مواضع LoxP، وبذلك يتم الحصول على فأر يحوي جين NR1 المحاط بمواضع LoxP في كل خلايا الجسم باستثناء منطقة الـ CA1، أو بمعنى آخر يتم الحصول على طفرة استهدافية شرطية تمثل الفأر الغبي وهو ما أكدته اختبارات لاحقة ومنها متاهة الماء.

الشكل (4 - 10) : إنتاج الفأر الغبي (المغفل)



4 - 1 - 4 التحوير الجيني لإنتاج البروتينات العلاجية :

حقق الجمع بين تقنيات الاستئصال البايولوجي وتقنيات التحوير الوراثي المجازات واعدة على صعيد الحصول على كميات غير محددة من البروتينات البشرية العلاجية نادرة بنقاوة عالية وكلفة معقولة وفي بدء حقبة جديدة من عصر التقنيات المتقدمة التي تعتمد على النباتات والحيوانات عبر الوراثة لإنتاج هذه البروتينات العلاجية بدلاً من المخمرات الحيوية التقليدية بأوعيتها الفولاذية الضخمة ومعدات التحكم المعقدة والأوساط الزراعية التخمرية المكلفة مع ضرورة التعامل الحذر مع اللقاحات الحيوية ومشاكل التلوث وتردي الإنتاجية وعمليات التنقية. إذ وفرت التقنيات الأحيائية بديلاً أكثر سهولة وأماناً وأقل كلفة.

إن إمكانية إنتاج مكونات الدم البشري في المزارع الحيوانية الحية كإنتاج بلازما الدم والأجسام المضادة في البلازما وبروتينات الدم الأخرى، يمكن أن توفر مصدراً ثابتاً لمنتجات الدم الرخيصة والأمنة تبلغ قيمتها بحدود 2.5 مليار جنيه استرليني من مجمل سوق منتجات الدم في العالم الذي يناهز 7 مليارات جنيه في العام الواحد، وكسائر الأدوية الجديدة ما زالت البروتينات البشرية المنتجة بالتحوير الجيني تحتاج إلى اختبار دقيق لمعرفة فعاليتها وسلامتها قبل السماح باستخدامها.

ونتيجة لمشاريع بحثية مفضية، ولدت في العام 1996، أنثى الخنزير التي أطلق عليها اسم «جيني» وهي أنثى خنزير مخوّرة جينياً والتي يحتوي حليبها على البروتين البشري (C) والذي يحتاج إليه المصابين بنوع من العوز الخلقي لدعم المخزون الضئيل من البروتين في أجسامهم، ويساعد هذا البروتين في التحكم بعملية التخثر، ويلعب دوراً مهماً في علاج المرضى الخاضعين لجراحة استبدال المفاصل.

اعتمدت تقنية التحوير الجيني على دمج شذفة (قطعة) من الدنا المثلثة للجين البشري المشفر للبروتين البشري (C) مع تعاقب (تتالي) لدنا الحفاز (المثير أو المحضض) (Promoter) لبروتين رئيسي في حليب الفئران هو بروتين المصل الحمضي Whey Acidic Protein وذلك لغرض ضمان التعبير الموقعي للجين في النسيج الثديية للخنزير حصراً وقد تم حقن شذفة الدنا المدمجة في مجموعة من أجنة الخنازير، وزرعت هذه الأجنة في أمهات بديلة من الخنازير وبعد أربعة أشهر وُلدت أنثى الخنزير الصغيرة «جيني» التي احتوت على الجين المشفر للبروتين (C) في خلاياها، وتحتم الانتظار لمدة سنة أخرى حتى بلوغها سن النضوج، حيث وجد أن الحليب المفرز احتوى على كمية من البروتين

(C) بحدود غرام واحد في كل لتر من الحليب، وهذا يعادل 200 ضعف تركيز هذا البروتين في بلازما دم الإنسان.

وأجريت دراسات مستفيضة تتعلق ببروتينات الدم الأخرى، ومنها بروتين منشط نسيج البلازمينوجين «مولد البلازمين» (Tissue Plasminogen Activator) ويعرف اختصاراً (tpA)، حيث تم استئصال الجين المشفر للبروتين في ماعز محوارة جينيا، وتضمنت تقنية التحويل الوراثي دمج الجين المشفر للـ (tpA) مع الجينات المنظمة التي تسيطر على عملية تعبير هذا الجين وإفراز البروتين مع الحليب ومن ثم حقن الجين ذو التركيب الوراثي الجديد في الأنوية الأولية للبيوض المخصبة للماعز.

وتمكن الباحثون في معهد «روزالين» في اسكتلندا من إنتاج أبقار ونعاج محوارة وراثياً تستطيع تصنيع بلازما الدم وبكميات بحدود 10 آلاف مرة أكثر مما يقدمه المتبرعون من البشر سنوياً، وبعد استنساخ الحمل «دوللي» أعلن الباحثون في معهد روزالين وشركة (بي. بي. ال. ثيراپيوتكس) «P.P.L. Therapeutics» عن استنساخ الحمل «بوللي» التي تحمل جينات بشرية (الشكل 4 - 11) وهي واحدة من خمسة نعاج ولدن لأمهات مختلفات وبطريقة الجمع بين التحويل الجيني والاستنساخ البايولوجي.

4 - 1 - 3 تقنية الخلايا الجذعية والاستئصال البايولوجي:

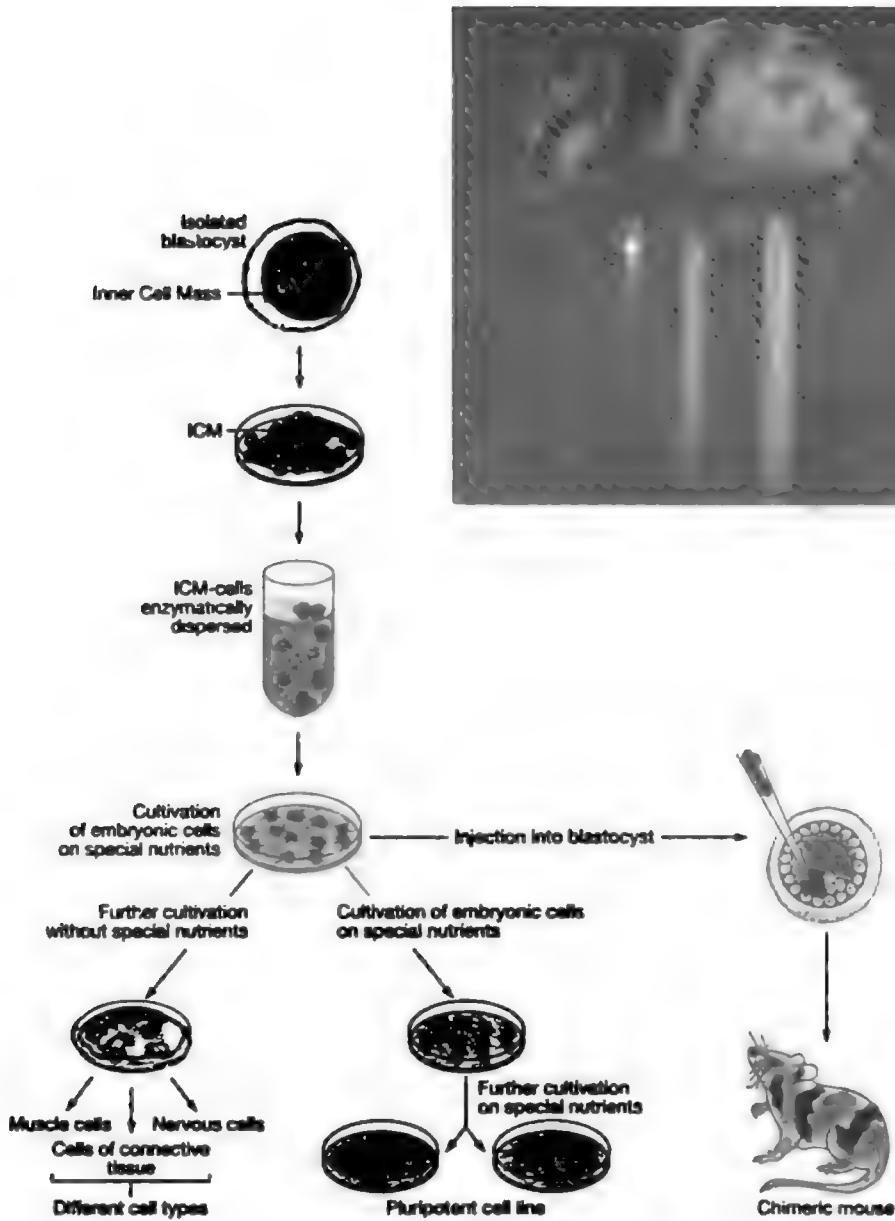
تشكل تقنية الخلايا الجذعية الجنينية أحد أهم التقنيات المتقدمة التي يمكن أن ترافق وتتكامل مع تقنية الاستئصال البايولوجي في تطبيقات واعدة، حيث يمكن إنتاج خطوط خلوية من الخلايا الجذعية وافرة الجهد أو كامنة الفعالية Pluripotent Stem cells (الشكل 4 - 12) وذلك بتنمية الكيسة الأريمية في طبق بتري وبعد بضعة أيام تتطور كتلة الخلايا الداخلية (ICM)، حيث يتم فصل الكتلة الخلوية وتشتيتها أنزيميا وإعادة استنباتها في أوساط جديدة وعلى طبقة مغذية Feeding Layer من الفايروبلاست، إذ تتطور مجاميع من الخلايا التي يمكن حقنها في كيسة أريمية من حيوان آخر، وحدوث الاندغام في الكتلة الخلوية الداخلية منتجة فأراً متعدد المصادر الوراثية «هجين» كإمبرا (الصورة في الأعلى)، وفي حالة إعادة استنبات الكتلة الخلوية بدون طبقة مغذية مناسبة فإنها تتمايز مباشرة إلى الأنماط المختلفة من الخلايا، أما إذا تمت عملية الاستنبات وتنمية الخلايا الجنينية على مغذيات خاصة وتكرار العملية يؤدي إلى الحصول على خطوط خلوية من الخلايا الجذعية كامنة القدرة أو الفعالية، حيث يكون لهذه الخلايا العديد من التطبيقات المهمة (الشكل 4 - 13).



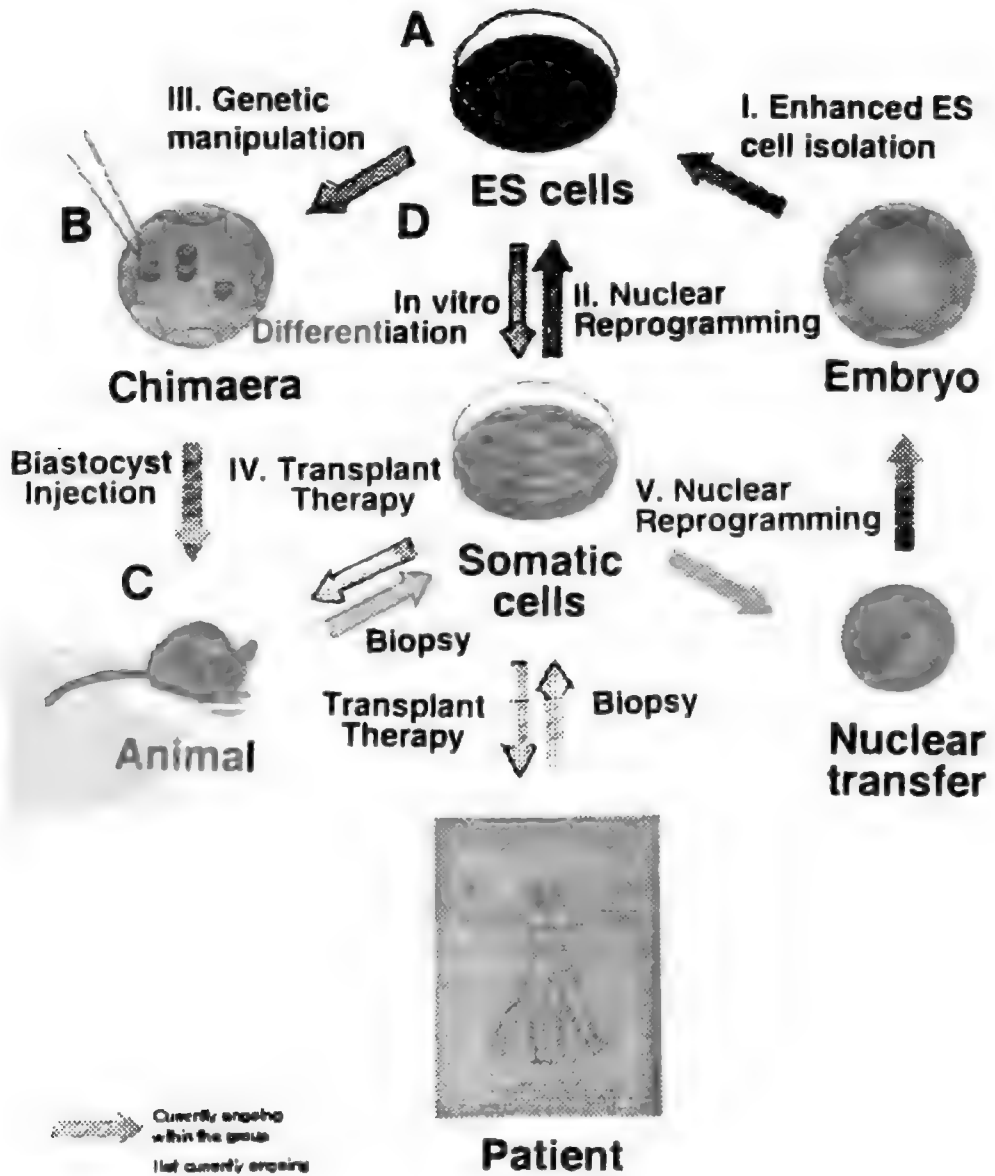
النعجة «بوللي» التي تحمل جينات بشرية . . و «بوللي» وأمها في الصورة داخل الإطار



الشكل (4 - 11): شمل التحوير الجيني حيوانات اقتصادية مختلفة كالنعاج والأبقار .
 في الأعلى النعجة «بوللي» الحاملة للجينات البشرية أنتجها معهد «روزالين» والصورة في
 الأسفل للعجل «جين» الذي تم استنساخه في «ديفورست»



الشكل (4 - 12): إنتاج خطوط خلوية من الخلايا الجذعية وافرة الجهد أو كامنة الفعالية.



الشكل (4 - 13): التطبيقات المختلفة للخلايا الجذعية الجنينية ومنها العلاج بغرس الأنسجة والأعضاء والطرق المختلفة للحصول على الخلايا الجذعية الجنينية

4 - 1 - 4 العناصر المنظمة النوعية للأنسجة :

Tissue - Specific regulatory elements

إن القدرة على بناء جينات كائيرية «خيمرية» (Chimeric genes) ومن ثم إدخال هذه الجينات إلى موروث الفأر بالحقن المجهرى قد سمحت للعلماء بإجراء البحوث داخل الحي (in vivo) ودراسة التعاقبات المنظمة لتعبير الجينات في الحيوانات اللبونة .

وتوجهت هذه البحوث نحو تحليل العناصر المنظمة للجينات التي يتم التعبير عنها بمستويات عالية في أنواع معينة من الخلايا في حيوان توضح تنظيم تعبير الجينات التي تعبر في خلايا متعددة مختلفة يكون أكثر صعوبة .

وهناك افتراضان أساسيان حرجان بالنسبة لإمكانية استخدام الفئران المهندسة وراثياً لتشخيص ودراسة العناصر المنظمة :

الافتراض الأول : هو أن التنظيم يتحقق من خلال تعاقبات نوعية من الدنا الذي يقع ضمن أو بالقرب من المنطقة المستنسخ .

أما الافتراض الثاني ، فهو أن هذه التعاقبات يمكن أن ترتبط بتعاقبات مشفرة غير ذات علاقة (unrelated coding sequences) يمكن غرسها في مواقع جديدة في الموروث مع احتفاظها بخواصها التنظيمية ، وبعبارة أخرى فإن تنظيم الجينات يفترض أن يعود وظيفياً إلى تعاقب من الحامض النووي يقابل المواقع الكروموسومية ، والبروتين المنظم الوثيق الصلة من المفروض أن يكون قابل للانتشار وموجود بوفرة حتى يمكنها إيجاد العوامل المنظمة المشابهة (cognate) حتى في المواقع الجديدة novel على الموروث .

ومن الاستراتيجيات الفعالة لدراسة العوامل المنظمة هو من خلال عمل جينات كائيرية التي تحوي على العناصر المنظمة المفترضة من أحد الجينات المرتبطة بالتعاقب المشفر لأحد الجينات المخبرة (Reporter gene) غير ذات الصلة .

وغالباً ما تستخدم جينات البكتريا كجينات مُخبرة وذلك لسهولة التعرف عليها ، وتشخيصها في الفئران عبر الوراثة إضافة إلى الافتراض بكونها لا تحوي أية عناصر

منظمة يمكنها العمل في الحيوانات اللبونة . وفي جينات حقيقية النواة وأيضاً بدائية النواة فإن منطقة الموروث الواقعة أعلى المجرى (up stream) أي الواقعة إلى الأعلى من نقطة أو موقع بدأ الاستنساخ هي منطقة الحفاز (Promoter) والتي تحتوي على التعاقب نيوكليوتيدي الذي يحث ويحفز تعرف أنزيم بلمرة الرنا (RNA polymerase) وارتباطه بشريط الدنا وبدء عملية الاستنساخ، حيث أن كل جين يمتلك منطقة حفاز فكيف يتم تأسيس الخصوصية النسيجية ؟ وهل التعاقب الذي يؤكد تعبير جين النسيج المتخصص يتموضع قرب الحفاز أو في منطقة بعيدة عنه .

وأظهرت البحوث حول الفئران عبر الوراثة (transgenic mice) بأن العديد من الجينات تملك عوامل منظمة نوعية أو متخصصة للنسيج تكون ذا موقع أقرب إلى الحفاز ضمن الأزواج القاعدية الـ 1000 - 2000 الأولى الواقعة في أعلى المجرى من موقع بداية أو بدء الاستنساخ وكنموذج أو مثال متخصص أو نوعي هو الألفا - أ - كرسالين - α A - crystallin والذي يعبر بصورة نوعية في خلايا عدسة العين (Lens cell of the eye) والبروتين يعمل على تزويد العدسة بشفافية فريدة (unique transparency) والتي هي العامل الحاسم في وظيفة الجهاز البصري .

وتم استنسال جين الألفا - A - كرسالين وقطعة من الدنا تحوي على 450 زوج قاعدي متاخمة لموقع بدء الاستنساخ تم ربطها إلى التعاقبات المشفرة من جين المخبر البكتيري الأصل والفأر المبرمج تم توليده بالحقن المجهرى للجين الكايميري وتم اختبار الفأر من حيث أنماط التعبير للبروتين البكتيري والأنزيم البكتيري تم تحديده على وجه الحصر في العيون للفئران عبر الوراثة .

وتعبير الجين العابر (المتحول وراثياً) transgene لم تستهدف النسيج الصحيح حسب بل بدأت بذات المرحلة الجنينية لتطور العدسة كما هو الحال في مورث - A - α crystallin الداخلي المنشأ (الأصيل) .

وأوضحت هذه الدراسات بأنه حتى الأشرطة القصيرة من الدنا يمكن أن تحوي تعاقبات منظمة والتي تكون كافية لتزويد نوعية النسيج وتنظيم الجينات النوعية للمرحلة

حتى عندما تتصل مع تعاقبات مشفرة غير ذات صلة وعندما تدغم أو بتكامل مع مواقع جديدة في الموروث .

وأجريت دراسات أخرى على العديد من جينات النوعية النسيجية لحقيقة النواة تتراوح بين الالاستيز (Elastase) إلى الأنسولين (Insulin) إلى البروتامين Protamine وإلى الرودوبسن Rhodopsin وإلى اميونوكلويبولينات imunoglobulins التي أعطت نتائج مشابهة ويمكن للتعاقبات الواقعة قرب موقع بدأ الاستنساخ وغالباً بحدود - 150 100 زوج قاعدي أن تحدد بدقة التنظيم النوعي للنسيج الموجه لتعبير الجين في الفئران عبر الوراثة، ولكن هذه العوامل المنظمة غالباً ما تكون غير كافية لإنتاج المستويات العالية من التعبير والتي تعد صفة من صفات الجينات الداخلية المنشأ. لذا فإن العوامل المنظمة الإضافية التي يمكن أن تتواجد قد تحفز فعالية تعاقبات الحفاز الأقرب أو الأدنى (Pro moter Proximal Sequenas) وتؤدي إلى زيادة وتحفيز التعبير .

ومن الأمثلة الموصوفة جيداً للعوامل المنظمة التي تحفز فعالية منطقة الحفاز حتى تلك التي تتموضع بعيداً هو جين الهيموكلوبين hemoglobin gene والهيموكلوبين .

هو تترامير (tetramer) يتكون من تحت وحدات اثنان نوع ألفا α واثنان نوع β كلوبين globins subunits والألفا والبيتا كلوبين تعبر بصورة نوعية في خلايا الدم الحمراء وبصورة مثيرة للاهتمام فإن هناك نوعان منهما، جنيني وبالغ والكلوبيينات الجنينية تسمح لكريات الدم الحمراء الجنينية باقتناص الأوكسجين من النوع الناضج أو البالغ للهيموكلوبين في الدورة الأمية (Maternal circulation)) وضمن الموروث لمعظم الأحياء حقيقة النواة الراقية وبضمنها الإنسان والفأر فإن جين الألفا والبيتا كلوبين تكون ضمن عناقيد Clusters وفي مناطق مختلفة من الموروث .

ويتاح خلال التطور الطبيعي نمط متوات Sequential Pattern من التعبير ضمن كل عنقود جيني وبذلك يتم التعبير عن الوحدات الثانوية Subunits الجنينية أولاً والتي يتم استبدالها لاحقاً بتعبير عالي المستوى في الأشكال الناضجة (adult form).

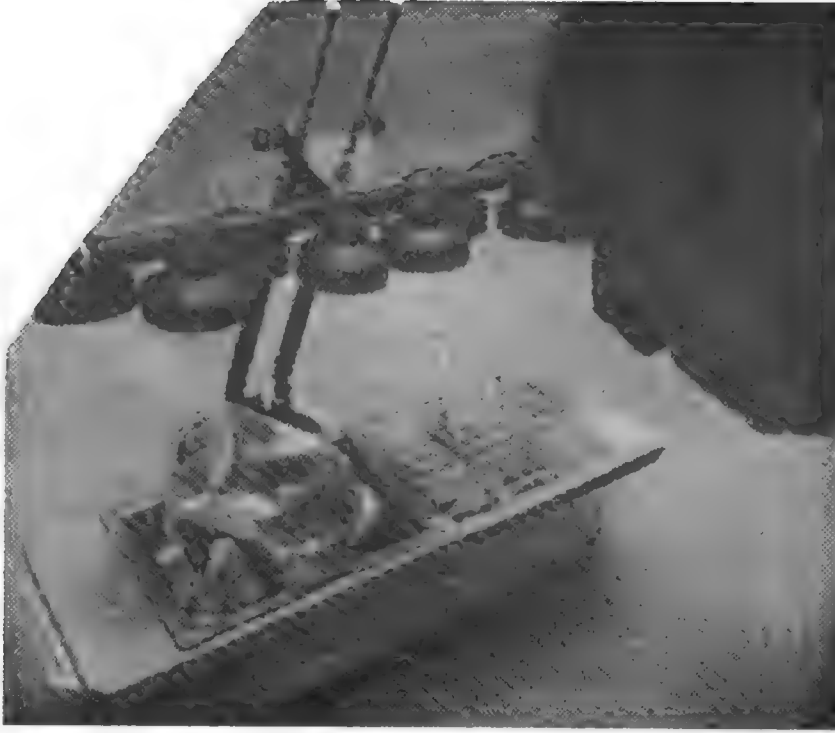
فما هي أهمية وجود الجينات في عناقيد (تعتقد الجينات) وضرورته لأنماط التعبير

جيني أو أنها ببساطة تعكس حقيقة أن الجينات في كل عنقود مرتبطة تطورياً أو افتراضياً
في تشتت الواحدة من الأخرى؟

وتمكن العلماء باستخدام الفئران عبر الوراثة من دراسة تنظيم جين الكلوبين (glo bin) والتجارب الأولية بينت بأن مناطق تعاقبات الحفاز الأقرب المجينية يمكنها أن توفر تعبيراً نوعياً للأنسجة tissue - specific ونوعياً للمرحلة Stage - specific للكلوبين الجنيني والناضج وعموماً فإن الجينات العابرة (Transgenes). كانت بالكاد ذات تعبير محسوس أو لم تعبر إطلاقاً.

وهذه النتائج دعت العلماء إلى الشك بوجود مناطق تنظيمية إضافية مهمة. وقد تبين أن التعاقبات المجينية (الموروثة) المحيطة بعنقود الجينات الكلية للبيتا - كلوبين تكون حساسة بصورة فريدة للهضم بأنزيم الدناز DNase I في الخلايا الدموية الحمراء تحديداً وليس في أي نمت آخر من خلايا، وهذه الحساسية الفائقة للقطع بأنزيم DNase I تشير إلى أن التعاقبات المجينية في هذه المناطق هي ذات شكل مفتوح (Open) وبالشكل الذي يجعلها متاحة ومهيأة للتداخل مع البروتينات المنظمة الإيجابية (Positive Regulatory Proteins) وحين تم استئصال المناطق ذات الحساسية الفائقة للقطع بالأنزيم وربطت مع تتابعات الحفازات للكلوبين أصبحت هذه الحفازات ذات فعالية كاملة في الفئران عبر الوراثة وسميت عناقيد المواقع الفائقة الحساسية لأنزيم الدناز I بالمناطق المنشطة لمواقع الكلوبين globin Locus Activating Region (LAR) وتكون مواقع الـ (LAR) فعالة حتى عندما تكون على بعد أكثر من 10.000 زوج قاعدي من متلازماتها وحفازها مما يعني وجود نوعاً من الاتصال ضمن الموروث.

وتتوفر الآن وعلى نطاق تجاري الكثير من العدد التشخيصية للتعبير الجيني (الشكل 4 - 15) مثل العدة المجهرية GFP - MD56 والتي تكشف عن الفئران عبر الوراثة التي استنسل فيها الجين المرغوب ونجح في التعبير باستخدام ضوء متفلور خاص، حيث عند تسليط ضوء فلورسنت خاص تظهر الفئران الحاوية على الجين المستنسل مضيئة.



الشكل (4 - 15) : عدة الكشف عن التعبير الجيني في الفئران عبر الوراثة.

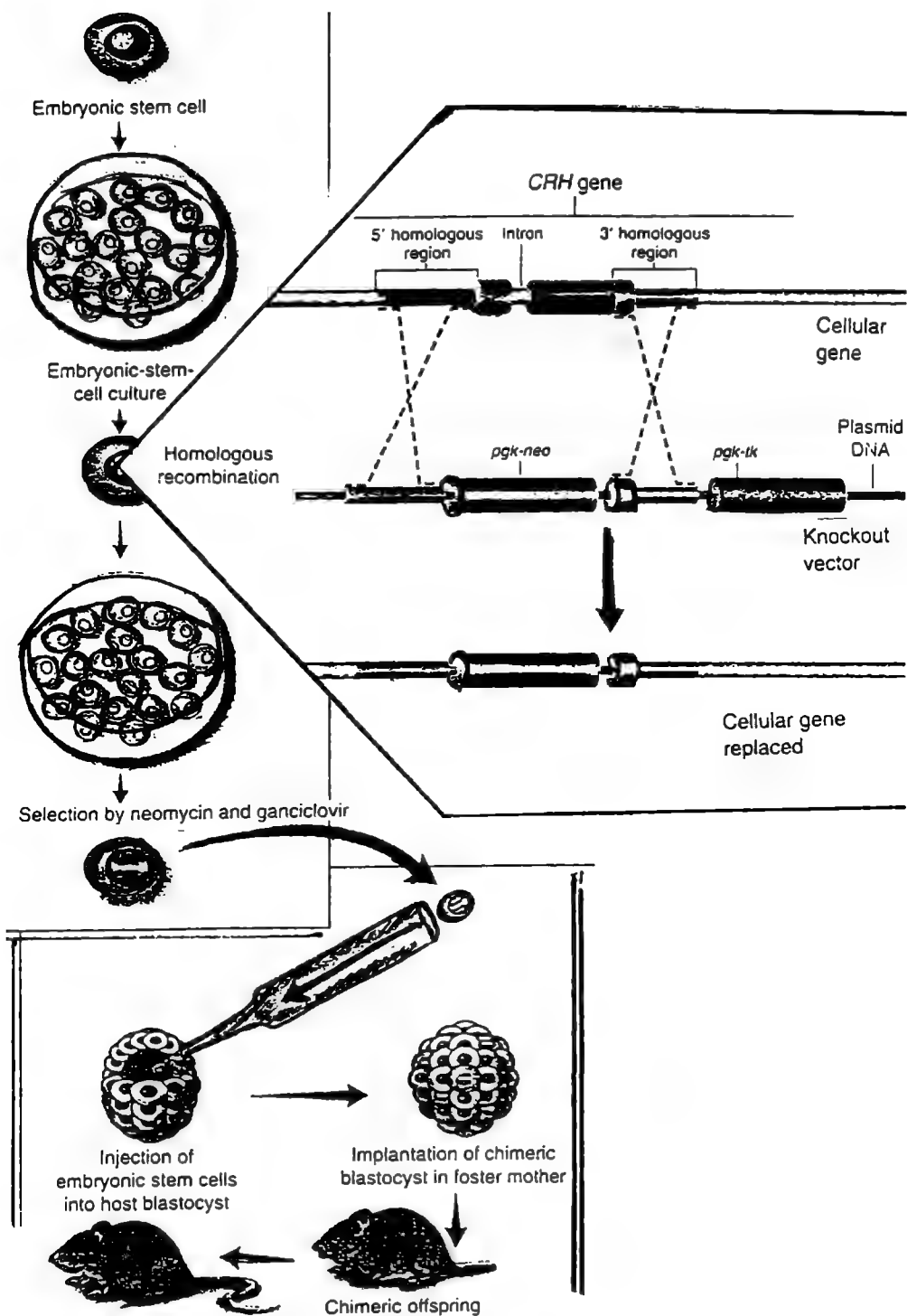
4 - 1 - 5 التأسيس الموقعي الموجّه :

يستخدم هذا النمط من التأسيس المتماثل Homologous Recombination في الحصول على حيوانات بطفرات مستهدفة في أحد الجينات الخلوية وبذلك يمكن دراسة تأثير غياب التعبير الجيني لبروتين ما يتم استهدافه دون غيره من الجينات تستخدم في هذه التقنية (الشكل 4 - 16) الخلايا الجذعية (ES) الحاوية على الجين المشفر للهرمون المحرر للكورتيكوتروبين (CRH) ويتكون من التابع الفعال (الأكسون - 1) والتابع غير المشفر 5' يليه التابع غير الفعال (الانترون)، ثم منطقة التابع الفعال الثانية (الأكسون - 2) والمنطقة غير المشفرة 3' ، وتعتمد هذه التقنية على نوع فريد من النواقل تعرف بنواقل الاستهداف Knockout Vectors (تعرف كلمة Knockout بـ"ملاكمة بالضربة"

حسمة) تتكون هذه النواقل من التجمع الخطي لمجموعة شدف الدنا التي تصل الشدفة 5 إلى الجينان المدمجان (جين كايناز الفوسفوكليسريت مع جين النيومايسين البكتيري Pgk - Nec) مع وجود شدفة تعليق Flanking Segment بين المنطقة 3 مع الجين خلوي (CRH) والجينان المدمجان (كايناز الفوسفوكليسريت وجين كايناز الشميدين تغايروسي) (Pgk - tk) وبعد إتمام تصنيع البنية الجينية للنواقل الاستهدافية يتم إيلاج نواقل في مزروع الخلايا الجذعية الجنينية، حيث يحدث تأشيب مزدوج Double Recombination بين الناقل الاستهدافي والجين الخلوي (الأسهم المقطعة) في منطقتي تماثل 5 و 3 ويتنتج عن ذلك اندغام الناقل الاستهدافي الحاوي على التركيب الجيني (Pgk - neo) دون التركيب (pgk - tk) في الموروث الخلوي للخلايا الجذعية الجنينية.

إن وجود التركيب الجيني (Pgk - neo) وغياب التركيب (Pgk - tk) في الجينات مُستبدلة (الإحلال الجيني لجين ما بدلاً من جين آخر) يمكن أن يؤدي إلى بقاء الخلايا الجذعية الجنينية حية عند الانتخاب الإيجابي والسلبي في الأوساط الحاوية على مضاد الحيوية النيومايسين وعقار الكانسيكلوفر Ganciclovir ولا بد هنا من التوقف قليلاً للتطرق إلى كيفية حدوث عملية الانتخاب، حيث يمثل جين النيومايسين أحد الجينات المسؤولة عن التشفير للمقاومة لمضاد الحيوية النيومايسين لذلك لن تنمو أي من الخلايا الجذعية في الوسط الحاوي على المضاد ما لم يكون الجين فعال وظيفياً وهذا يعني أن الاستبدال أو إحلال الجينات قد حدث، أما في حالة عقار «الكانسيكلوفر» فإن هذا العقار يتحول بواسطة أنزيم كايناز الشمدين إلى مادة متأيضة وسطية سامة للخلايا الحاوية على جين الـ (tk) واعتماداً على هذه الصفة يمكن انتقاء الخلايا.

يتم حقن نسيلا الخلايا الجذعية الجنينية الطافرة في الكيسة الأريمية للمضيف ويتم بعدها غرس الكيسات الأريمية في أمهات مرضعات ذات حمل كاذب Pseudo Pregnant ويمكن الحصول على هذه الأمهات المرضعات ذات الحمل الكاذب من خلال التهيئة الهرمونية لجعل الرحم قادراً على استقبال البويض والتصاقها بها وذلك بإجراء التزاوج بين هذه الإناث وذكور مقطوعة القناة الدافقة للحيامن (عقيمة) لغرض تحفيزها لإنتاج الهرمونات بواسطة الجسم الأصغر Corpus Luteum ، ويمكن أن تتطور هذه الأجنة إلى ذرية كيمرية Chimeric offspring.



الشكل (4 - 16) : التأشير الموقعي متمائل الأصل بين الجين الخلوي وناقل الاستهداف (Knockout Vector) لإنتاج فأر يفقد للهرمون (CRH) المحرر للكتوتروپين Corticotropin Releasing Hormone.

4 - 2 الأهداف الاقتصادية للاستئصال البايولوجي:

على الرغم من أن بلدان العالم الثالث تمتلك حوالي 75 % من الحيوانات المنتجة للحليب واللحم في العالم إلا أن إنتاجها لا يتعدى 21 % من الإنتاج العالمي للحليب و 34 % من الإنتاج العالمي من اللحوم بسبب عدم اتباع الأساليب الصحيحة في الرعاية والإدارة وقلة المراعي ومصادر التغذية المناسبة وقلة الإنتاجية والكفاءة الوراثية وعدم تطبيق طرق متقدمة في التحسين الوراثي، ويعد التلقيح الاصطناعي في الأبقار مثلاً من الطرق المعتمدة عالمياً في الحصول على أبقار ذات إنتاجية عالية ومواصفات جيدة وذلك بتلقيح الأبقار تلقيحاً اصطناعياً بسائل منوي يتم الحصول عليه من ثيران متخبة، حيث يمكن لثور محسن واحد أن يلقح أكثر من 10.000 بقرة خلال الموسم الواحد.

وبالرغم من أن أهمية هذه التقنية في الحصول على حيوانات مزرعة ذات نوعية وخصائص متميزة فإن الاستئصال بشقيه (الانقطاع الجيني واستئصال الخلايا الجسمية) واستخدام تقنيات التحويل الجيني يمكن أن يشكل مع التلقيح الاصطناعي ثورة وتقدماً غير مسبوق في هذا المجال خصوصاً في الإنتاج الكمي للخراف والأبقار وفي إنتاج حيوانات محورة جينياً قادرة على إنتاج البروتينات العلاجية. ولكن شيئاً من ذلك لن يتحقق بالتأكيد إلا بتوفر شرط في غاية الأهمية وهو تطوير كفاءة التقنية، حيث أن نسبة النجاح لم تتجاوز 3 % في معهد روزالين لغرض تقليل الكلفة الاقتصادية (بلغت كلفة إنتاج النعجة «دوللي» بحدود 650 ألف دولار).

وأنفقت شركة PPL للعلاجات 4 مليون دولار لإنتاج البقرة «روزلي» Rosie المحورة جينياً لإنتاج حليب مدعم بالأحماض الأمينية. ويشير مسؤول إدارة البحوث في الشركة آلان كولمان (Alan Colman) إلى أن استخدام تقنيات الاستئصال سيوفر حيوانات محورة جينياً مستنسلية قادرة على إنتاج البروتين العلاجي المطلوب بكميات كبيرة (بسبب مضاعفة الجينات المسؤولة عن إنتاج البروتين لمئات أو آلاف المرات) مقارنة بالحصول على

خروف واحد أو اثنين فقط من كل عشرة خراف قادرة على إنتاج البروتين المطلوب للاستئصال وبذلك يكمن الهدف في إيجاد طرق سريعة وكفوءة لزيادة أعداد حيوانات معينة تكون لها سمات وصفات وراثية خاصة ومرغوبة، وعلى الرغم من النجاح المتحقق فإن الكثير من الاعتراضات تتم إثارتها من قبل جمعيات خاصة (الشكل 4 - 7) ترفض بشدة هذا النوع من التلاعب والتحوير الوراثي وتمارس الاحتجاج ضده.



الشكل (4 - 17): تشير التقنيات الحيوية الجديدة ومنها التطويع الجيني للحيوانات الاقتصادية الكثير من الاعتراضات والاحتجاجات من قبل جماعات الرفض (في الصورة إحدى هذه الجماعات) وهي تعلق الملصقات المنددة بالتطويع الجيني للأبقار التي تقوم بها شركة (Embrytec) الألمانية والتي تعمل على تطوير تقنيات الأجنة لحيوانات المزرعة.

4 - 3 الأنظمة المتقدمة لنقل الجينات:

نظام مسدس (إطلاق) الجينات "هيليوس":

هيليوس (Helios) كلمة تعني (إله الشمس في الميثولوجيا الإغريقية) وقد أطلقت ذكاء على نظام من أكثر الأنظمة تقدماً في إيلاج الجينات، ويمكن استخدامه بكفاءة عالية في تجارب التنبيغ (الاندماج الاستيعابي) Transfection وفي التلقيح بلفاحات الدنا DNA Vaccination والتمنيع الوراثي، حيث يمكن باستخدام هذا المنهج التقني إيلاج الجينات بدلاً من البروتينات ذات الحجوم الجزيئية العالية والمعقدة، ويحد من الحاجة إلى عمليات تنقية المعقدة للبروتينات ويتطلب كمية قليلة نسبياً من الدنا، ويمكن استخدام مسدس (إطلاق) الجينات في العلاج الجيني ونقل الجينات في الحي in vivo إلى الأنسجة والأعضاء المستهدفة لتصحيح الاعتلالات الوراثية ولعلاج الأمراض السرطانية والمخمجة، ويساعد في اكتشاف البروتينات العلاجية المحتملة والتعرف على الجينات المساهمة في تثبيط أو تحفيز وتعزيز نمو الأنسجة. تم تطوير هذا النظام في نقل الجينات بتعاون بين شركتي (Bio - rod) و (Auragen) وباعتماد على نظام أكسيل (Accell) ووحدة قذف الهليوم البالستي Biolistic PDS 1000/He Bombardment PDS 1000، يتكون الجهاز (الشكل 4 - 18) من خرطوشة تحميل النموذج Loding Sample Cartridges الحاوية على 12 حجرة تعبئة وهي حاوية دائرية قابلة للإزالة والإرجاع إلى مكانها المخصص في أعلى الجهاز، تملأ الخرطاطيش بكميات محددة من الدنا وجزيئات (دقائق) الذهب المطلية بمادة ذات ألفة عالية للارتباط بالدنا أو الرنا ويعاد وضع الخرطوشة في مكانها. ويمكن استخدام الجهاز بكفاءة عالية في إيصال دقائق وجزيئات الذهب عالية الكثافة والمغطاة بالدنا أو الرنا، ويؤدي الانفجار القوي والفوري للهيليوم إلى دفع الدقائق المغطاة بالحامض النووي إلى اختراق الخلايا المستهدفة. يوفر هذا النظام إمكانية دراسة الأحماج الفايروسية التي تصيب النباتات والحيوانات ودراسة تنظيم فعالية الحفازات Regulation of Promoter Activity، ويمتاز نظام مسدس الجينات بكونه يوفر طريقة أكثر سرعة وبساطة لنقل الدنا والرنا من الحقن المجهرية والتخلص من التأثيرات الجانبية غير المرغوبة التي تسببها النواقل الفايروسية، وتحد أيضاً من الاستجابة السمية التي تحفزها وسائط نقل الدنا المعتمدة على الدهون Lipid - based DNA Delivery.



Helios Gene Gun

الشكل (4 - 18): نظام هيليوس (مسدس الجينات) من الأنظمة المتطورة في إيصال الجينات إلى الخلايا المستهدفة.

الفصل الخامس

الاستنسال البايولوجي

(المحاولات الأولى)

5 - الاستئصال البايولوجي ... المحاولات الأولى

5 - 1 مقدمة:

لم يكن الإعلان عن استئصال «دوللي» وليد اكتشاف تقنية محددة أو ناتج عن انبثاق فكرة نظرية مجردة في خصوصيتها، ولم يكن في الوقت نفسه مفهوماً تقليدياً من مفاهيم هندسة التكاثر، بل كان نتيجة جهود مضيئة واعتمد على تطور مجموعة التقنيات العائدة لعلوم متعددة، كالوراثة والهندسة الوراثية والفسلجة الحيوانية والأجنة والغدد الصماء وفسلجة التناسل، والكيمياء الحيوية، وتحسين الحيوان والأنسجة، والزراعة النسيجية.

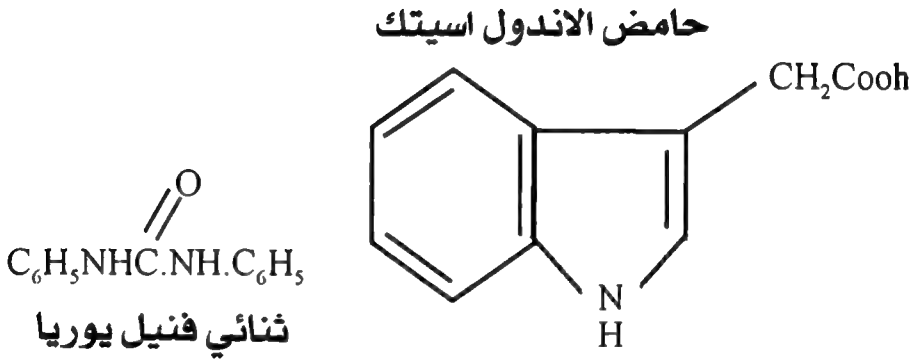
ولا بد لنا وقبل الولوج في المحاولات الأولى للاستئصال البايولوجي من التطرق إلى بعض الأساسيات في علم الخلية، هذا التركيب المدهش المليء بالأسرار، والمعجزة الألهية في الاستئصال والتضاعف والتكرار، ومن هذه الحقائق عدم وجود ارتباط أو علاقة بين الانقسام الخلوي المتتابع وبين نوع الخلية الحية أو بموقعها من الكائن الحي، حيث تتشابه جميع الخلايا الحية في قدرتها على الانقسام المتتابع في حالة توفر بعض الظروف الملائمة في البيئة المحيطة بها، وتمكن العلماء من إثبات صحة هذه الحقيقة بصورة عملية من خلال تحويل بعض الخلايا النباتية البالغة والمتوقفة عن الانقسام منذ زمن بعيد إلى خلايا دائمة الانقسام ونامية بنشاط.

ونجح العلماء في استنبات نباتات كاملة تعود إلى نفس النوع بدأ من خلايا نباتية مفردة، ويمكن الاستنتاج من هذه التجارب بعدم وجود شيء خاص في البويضة المخصبة (والتي ربما تكون أقل الخلايا الحية تخصصاً) له علاقة سببية مباشرة ومحددة بآلية الانقسام المتتابع، وبينت تجارب أخرى أجريت على شرائح من جذور نبات الجزر (عادة ما تكون خلايا الجذور في هذا النبات فاقدة للمقدرة على الانقسام والنمو في الظروف الاعتيادية).

ومن بين مجموعة متعددة من الأوساط الغذائية المختلفة التي استخدمت في تنميتها، كان لوسط حليب جوز الهند (السائل الذي ينمو عليه جنين نبات جوز الهند) فعالية كبيرة في تحفيز إطلاق آلية الانقسام المتتابع في خلايا جذور الجزر، وأدت إلى تضاعف وزن هذه الشرائح بحدود 80 مرة خلال 20 يوماً فقط، وفي الحقيقة فإن هذا التحفيز كان انتقائياً إلى حد كبير في الوقت الذي دفع فيه خلايا جذور الجزر إلى النمو بجنون بإطلاقه لآلية خاصة كانت ساكنة أو هامدة في الظروف الاعتيادية فإنها لم تؤثر في درنات البطاطا، في حين أظهرت خلاصات نباتية أخرى كخلاصة خلايا البصل تشييطاً أدى إلى إيقاف عملية النمو بصورة كاملة.

ولا بد هنا من الإشارة إلى أن قدرة الخلايا الاعتيادية على النمو والتحول إلى نبات كامل تقود إلى الاستنتاج بأن هذه الخلايا ومهما كان موقعها تحتوي على نفس المادة الوراثية (الحامض النووي DNA) الموجودة في البويضة المخصبة والقادرة على تكوين الكائن الحي الكامل.

وحيث إن أغلب أنواع الخلايا تعد من الخلايا المتخصصة فإن هذا يعني أن نظاماً بالغ الدقة يسمح باستخدام جزء من هذه الذخيرة الوراثية والذي يتلائم مع وظيفة هذه الخلايا وتخصصها ولا يسمح باستخدام الجزء المتبقي من هذه المعلومات، وهنا يبرز التساؤل حول السبب في عدم تحول الخلايا الجسمية إلى أجنة؟ وماهي آلية السيطرة الجينية التي تحكم تصرفاتها وتتحكم في انقساماتها وتجعلها تؤدي مهام وظائفها حصراً؟ ووجد العلماء أن الاختلافات بين هذه الخلايا وبين البويضات المخصبة يتمثل في طبيعة الوسط المحيط بهما والذي ربما يعود إليه العامل المحدد لطبيعة وظيفة كل منهما، وحيث أن وسط حليب جوز الهند أظهر تحفيزاً للانقسام المتتابع، فقد تم تحليل مكوناته ووجد أنه يحتوي على مركبات كيميائية محفزة للانقسام المتتابع المذكور ووجد من ضمنها مادتين تدخل ضمن مجموعة الهرمونات النباتية وهي مادة حامض الأندول استيك وثنائي يوريا (الشكل 5 - 1) مع وجود مركبات (معضدة) مساعدة أخرى كالكحولات متعددة مجاميع الهيدروكسيل والتي تزيد من فعالية ونشاط الهرمونات النباتية في حالة وجودها معها.



الشكل (5 - 1) : التركيب الكيميائي لبعض المحفزات النباتية الموجودة في وسط حليب جوز الهند.

وتتواجد هذه المركبات في الوسط المحيط بالجنين والمعروف بالاندوسبرم، وهي التي تدفع البويضة المخصبة وخلايا الجنين إلى الانقسام المتتابع. وهنا يبرز التساؤل التالي: هل ينطبق الأمر نفسه على الكائنات الحية العائدة إلى المملكة الحيوانية؟ ووجد أن الجواب كان بالإيجاب فهناك العديد من نقاط التشابه بين الخلايا الحيوانية والنباتية والتي تتمثل بعدم تخصص البويضة المخصبة واحتواء الخلايا الجسمية على ذات المعلومات الوراثية والتي تحوي جميع المقومات اللازمة لتكوين الكائن الحي الكامل ووجود آلية سيطرة على التعبير الجيني تسمح بالتعبير الانتقائي للمعلومات المتعلقة بوظائفها التخصصية فقط، وأخيراً وجود الهرمونات الحيوانية والتي تعمل في الأحياء الراقية كاللبائن كمواد محفزة وحائثة Inducers لفعالية المورثات وذلك من خلال آلية التأثير على المورثات المنظمة، فبعض العوامل الحائثة كأنزيم التايروسين - A- كيتوكلوتاريت ترانس أميناز يزداد تركيزه بسرعة في الساعات القليلة قبل الولادة وله علاقة بالكورتيزون الذي تفرزه الغدة الكظرية.

وأجريت تجارب عديدة لتوضيح تأثير السايروبلازم على فعاليات النواة، فمعظم خلايا الكائن الحي تكون متخصصة للقيام بوظائف محددة وبالتالي فإن مورثات معينة ذات العلاقة المباشرة بوظيفتها هي التي تكون فعالة. أما أغلب المورثات الأخرى فتكون في حالة سكون وغير فعالة وبينت تجارب الخلايا الهجينة Hybrid Cells وهي خلايا

حاوية على نواة غريبة من مصدر مغاير للمصدر الذي تعود إليه الخلية المهجنة ونواتها الأصلية، إن النواة الغريبة قد استجابت لمحفزات السايكوبلازم مما أدى إلى كبر حجم النواة وتصنيع أنواع من الرنا المرسال الجديد، وقد أمكن التوصل إلى نتائج مماثلة في التجارب التي تضمنت نقل نواة نوع متخصص من الخلايا إلى خلية غير متخصصة وأزيلت نواتها مسبقاً، حيث استجابت النواة المنقولة من النوع المتخصص، وأنتجت الرنا المرسال وبروتينات جديدة وتمكنت النواة المنقولة من التحكم بالسيرورات المختلفة لفعاليات الخلية. وبذلك توصل العلماء إلى استنتاج بالغ الأهمية وهو عدم خصوصية السايكوبلازم تجاه نواة نوع معين من الخلايا وإن محفزات السايكوبلازم تمتلك القدرة على تحفيز الجينات لأية نواة أخرى منقولة إليها، وبينت تجارب أخرى أن إتلاف خلية واحدة من بويضة منقسمة إلى خليتين فإن الخلية الثانية تكون جنيناً كاملاً.

وأجرى العالم الألماني «سبيمان» تجربة رائدة أثبت فيها أن نواة واحدة بعد عدة انقسامات يمكن أن توجه عملية تكوين كائن حي كامل، وكانت فكرة التجربة غاية في البساطة والذكاء، إذ وضع هذا العالم الذئ خيطاً حول البويضة المخصبة وشده بقوة جعلت الخلية تتخصر إلى نصفين غير منفصلين أحدهما يحتوي على النواة والآخر على السايكوبلازم فقط، وبقيت النواة تنقسم في أحد النصفين مكونة مجموعة من الخلايا إلى أن تمكنت نواة واحدة من العبور إلى النصف الثاني (الحاوي على السايكوبلازم) وعند ذلك عمل «سبيمان» على فصل هذا الجزء عن بقية كتلة الخلايا ولاحظ أنه يمكن أن يكون كائناً كاملاً.

إن العلاقة بين الرنا المرسال ومراحل النمو الجنيني المبكر لخلايا البويضة ودورها في التعبير الجنيني اللازم للنشوء والتطور تتطلب إلقاء الضوء على عملية تكون البويضة، فعندما تصل الخلايا الجنسية في الجنين الأنثى إلى المبيض البدائي (في طور التكوين) تشكل كتلاً خلوية منتشرة بين الأنسجة الرخوة، وبعد ذلك تتفرق وتنتشر وتمر بمراحل نمو سريع ينتهي قبل ولادة الجنين وتتحول الخلايا الجنسية لتصبح الخلايا البويضية الأولية Primary Oocyte وهي في المبيض محاطة بخلايا الجريبية Follicular Oocyte، بعدها تدخل خلايا البويضية الأولية مرحلة الانقسام الاختزالي الأولى قبل الولادة وتتوقف في طور

تمهيدي وتبقى كذلك حتى بلوغ سن المراهقة، عندها تبدأ هذه الخلايا بالنمو على دفعات دورية (في اللبائن) وبفترات ثابتة في الإنسان (كل 28 يوماً تقريباً) وعادة ما تصل وحدة منها فقط إلى النضوج في كل مرة، تبدأ الخلية البيضية الأولية في مواصلة عملية الانقسام الاختزالي الأول وفي الوقت نفسه تنمو وتزداد حجماً وتتخفز مراحل النضوج في خلية البيضة بتأثير هرمون تفرزه الغدة النخامية يدعى الهرمون المحفز للجريب Follicle Stimulating Hormone وفي مراحل نمو البيضة هذه تنشط عملية تكوين الرنا m-RNA، حيث تكون بعض جينات النواة فعالة خلال هذه المراحل، ويتم تخزين هذه الجزيئات في السايوبلازم لفترة من الزمن قبل استعمالها لتكوين البروتينات بعد عملية الإخصاب والانفلاق. ولا بد لجزيئات الرنا المرسال أن تتوقف عن أداء وظيفتها بعد فترة زمنية قصيرة منعاً لحدوث الترجمة والتي تؤدي إلى فرط إنتاج البروتين المشفر له من قبل هذا الرنا المرسال وزيادة معدل تعبير الجين المشفر للبروتين يؤدي إلى خلل تنظيمي كبير في المراحل الحساسة والمبكرة من نمو الخلية، مما يشير الدهشة أن جزيئات الرنا المرسال الموجود في سايوبلازم خلية البيضة يشكل حالة استثنائية من حيث مدى البقاء وطول العمر.

إن هذه الخصوصية تنبع من كون هذه الجزيئات محمية من تأثيرات أنزيمات الإتلاف إضافة إلى كونها محاطة ببروتين يحميها من التأثيرات الأخرى، وأثناء نضوج خلية البيضة فإن جزيئات الرنا المرسال الحاملة للشفرة الوراثية أو للإشارة الضرورية لانقسام هذه الخلية بعد إخصابها ستتوافد من النواة إلى السايوبلازم وسرعان ما تصبح جزيئات الرنا المرسال المسؤولة عن الانقسام وتخليق هياكل خلوية جديدة فعالة. وأجريت تجارب لغرض التأكد من المعلومات الوراثية المخزونة في السايوبلازم، حيث تمت إزالة أنوية بويضات البرمائيات، ووخرها بإبرة لتحفيزها على الانقسام بدون نواة، وهذا ما حدث فعلاً، ولكن بعد عدد من الانقسامات، ماتت الخلايا ومن المحتمل أن ذلك الموت كان نتيجة لنفاذ الرنا المرسال المخلوق سابقاً عند وجود النواة قبل إزالتها وعدم تجده بغياها. يتم الانقسام الاختزالي الأول للخلية البيضية الأولية بشكل يجعل أحد الخلايا الناتجة (البنوية) صغيرة الحجم جداً ولا تحتوي من السايوبلازم إلا على كمية ضئيلة للغاية،

وتدعى هذه الخلية بالجسم القطبي الأول، وتنضج البويضة وتتحول إلى الخلية البيضية الثانوية Secondary Oocyte التي تدخل مباشرة مرحلة الانقسام النضوجي الثاني، وقبل إكمال هذا الانقسام تتحرر البويضة (في اللبائن) من المبيض وتسمى الحالة الإباض Ovulation، ولا يكتمل الانقسام الثاني إلا بعد حصول الإخصاب، وتكون البويضة عند إطلاقها محاطة بغشاء من المواد اللاخلوية وإلى الخارج منها طبقة من الخلايا الساندة، أن نضوج البويضة يعني قابليتها على بدء عملية التكوين الجنيني عند تحفيزها بعملية الإخصاب، وتتحول الحويصلة (البويضة + طبقة من الخلايا الطلائية المسطحة) إلى غدة صماء تدعى الجسم الأصفر.

وفي حالة عدم حصول تخصيب للبويضة فإن الجسم الأصفر يضمحل وعلى عكس ذلك فإنه ينمو ويفرز الهرمونات كالبروجسترونات التي تساعد على انجراح الحمل ويوجد حوالي 500.000 حويصلة في مبيض الأنثى ولكن عدد هذه الحويصلات يبدأ بالتناقص تدريجياً ويصل إلى 15000 عند وصول الفتاة إلى سن البلوغ وتحتوي كل حويصلة على بويضة ولكن لا ينضج من هذه البويض سوى عدد ضئيل 300 - 400 بويضة وبمعدل واحدة بالشهر ولمدة 30 عاماً تقريباً حتى الوصول إلى سن اليأس، وفي الحقيقة فإن جميع الحيوانات تنامي من خلية بيضة مخصبة واحدة، يمكن أن تمر في دورات عديدة من الانقسام لتعطي غالباً ملايين الخلايا الجنينية، التي تنظم معاً وتتناسق مدهش وبديع لتكوين الكائن الحي الكامل، نظام تكامل فيه العظام والجلد والعضلات والدماغ في وحدة شديدة التناسق مشكلة انجازاً بالغ الدقة والوضوح لظاهرة التنظيم الذاتي.

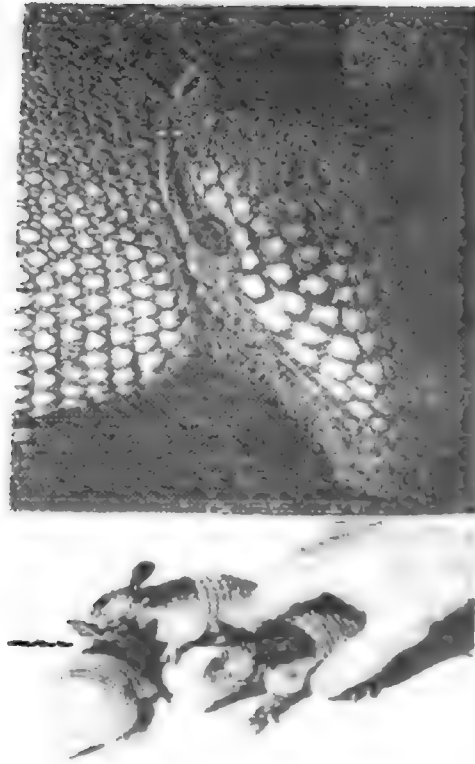
وتشكل ظاهرة التوائم أحد الأمثلة الرائعة للتناسق المدهش الذي يعمل فيه النظام الحي، إذ عندما تكون الأم في حالة طبيعية فإن أحد المبيضين يعمل كل شهر وينتج بيضة هذه البويضة هي واحدة من 20 بويضة يتحسسها جسم الأنثى ويختارها على أساس أنها الأفضل. وفي الشهر الثاني يرتاح المبيض الأول وينتج المبيض الثاني بيضة، ولكن في حالات أقل حدوثاً يمكن لكلا المبيضين أن يتجا بيوضاً وتلقح كل بيضة بحيمن وتكون التوائم في هذه الحالة غير متماثلة. أما إذا كان هناك بيضة ملقحة واحدة وتنقسم إلى خليتين تنمو كل منهما على حدة فتدعى التوائم في هذه الحالة بالتوائم المتماثلة. ويشير

حيوان المدرع الأمريكي (الشكل 5 - 2) الدهشة، إذ أن عدد مواليده دائماً أربعة وكلها من بيضة واحدة بالأصل، فعند تزاوج أنثى هذا الحيوان تتخصب بويضة واحدة فقط، سرعان ما تنمو إلى جنين والذي ينقسم في طور مبكر جداً من التكوين إلى اثنين، وهذه مورها تنقسم مرة أخرى لتكوين أربعة أجنة حاوية على نفس المورثات والصبغيات وبصورة أربعة توائم أو قرائن يتم إنتاجها بالانقسام الجنيني للبيضة المخصبة.

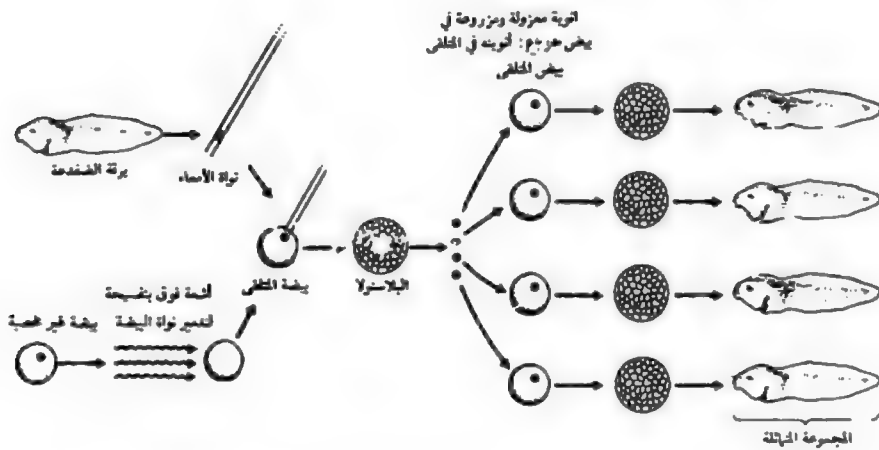
5 - 2 البداية المبكرة لتجارب الاستنسال:

تعود البداية الحقيقية لتجارب الاستنسال Cloning أو التكاثر اللاجنسي النسيلى إلى عام 1952 حين تمكن العالمان روبرت بريكرز (Robert Briggs) وتوماس كنك (Thomas King) من إجراء أول عملية استنسال لضفادع من خلايا لفرخ الضفدع أو الشرغوف Tadpole، وفي عام 1962 تمكن العالم جون كوردون (Gohn Gurdon) من إنتاج الضفادع الإفريقية من خلايا الشرغوف أكبر حجماً، (الشكل 5 - 3) باستخدام التكاثر النسيلى اللاجنسي (الاستنسال)، وذلك بالحصول على بيضة غير مخصبة من ضفدعة إفريقية وعمل على تحطيم نواتها بالإشعاع (استخدم الأشعة فوق البنفسجية «يمكن استخدام وسائل أخرى لإزالة وتحطيم نواتها كاستخدام مادة الكولجيسين أو إزالة النواة بالتطويع والجراحة المجهرية)، استبدل «كوردون» بعد ذلك نواة البيضة الأحادية بنواة ثنائية من خلايا أمعاء فرخ الضفدع، وبدأ بعدها البيض الحاوي على المجموعة الكروموسومية الثنائية المكتسبة في الانقسام كما لو كان قد تم تخصيبه ومرّ بالأطوار الجنينية إلى أن وصلت في بعض الأحيان إلى ضفادع بالغة كاملة، وقد استقبلت هذه الخلايا كل مادتها الوراثية من خلايا أمعاء فرخ الضفدعة (كواهة للنواة) وذلك بدلاً من إنتاج ضفادع تحتوي على المادة الوراثية لكلا الأبوين، ونظراً لحصول الباحث على توائم (متماثلة) لفرخ الضفدع الواهب والذي يظهر مسبقاً للوجود قبل ذلك بعدة شهور.

فقد أمكن إثبات أن المادة الوراثية التي تحتويها نواة خلية متخصصة عالية التشكل، استطاعت أن توجه النمو، حتى اكتمال نموها لتصبح ضفدعة كاملة طبيعية، وبينت النتائج أيضاً أن الضفدع الواهب للنواة (المادة الوراثية) يمكن أن يكون الأب الوراثي لعدة آلاف من النسل المتماثل وراثياً.



الشكل (5 - 2): حيوان المدرع الأمريكي (الأرماديلو) عدد مواليدته الثابت غالباً ما يشير اهتمام العلماء .



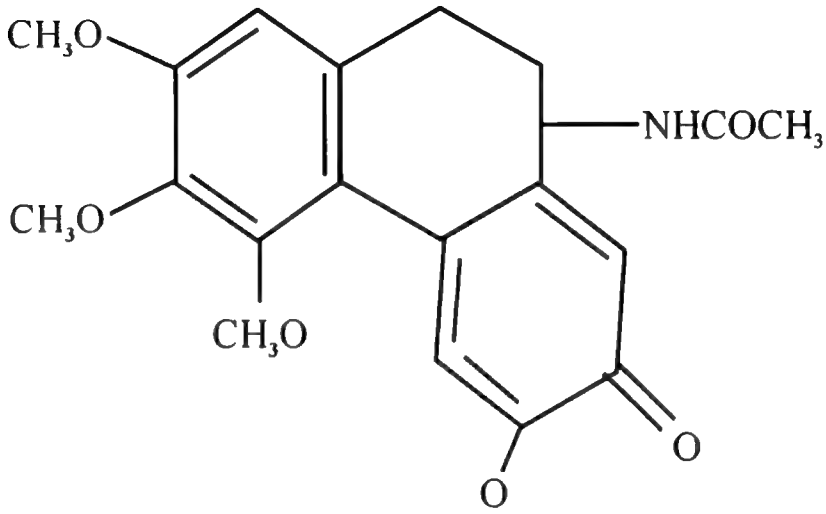
الشكل (5 - 3): تقنية الاستئصال التي استخدمت في الحصول على نائل متماثلة من أفراخ الضفدع الإفريقي .

وأجريت تجارب أخرى على خلايا متخصصة عالية التشكل للضفدعة، ووجد أن مدتها الوراثية أو أنويتها يمكن أن توجه النمو لتوائم أخرى من الضفادع إذا ما زرعت في بيض مناسب منزوع منه الأنوية، وهذه الخطوة ضرورية للحصول على توأم متماثل وراثياً من النسل ومماثل للخلايا الجسمية للكائن الحي الواهب.

إن معدل نجاح التجارب المجراة على الضفادع كان منخفضاً جداً وإن إمكانية تطبيقه على بيض الإنسان بالتأكيد سوف يكون أكثر صعوبة. كذلك تمتاز تقنيات نقل وزرع الأنوية وعمليات النمو في اللبائن بكونها أكثر تعقيداً عنها في البرمائيات، حيث أن النمو يحدث في جسم الأم وليس في مزارع مختبرية، كما تتطلب عملية إزالة الأنوية واستبدالها بأنوية ثنائية المجموعة الكروموسومية من الخلايا الجسمية مهارة كبيرة ودقة متناهية وأجهزة متقدمة مع ضرورة الحصول على بيض الثدييات بطرق لا تحدث الضرر فيها والحفاظ على حيويتها واستمراريتها وبقائها لحين إجراء التجارب عليها، ويتطلب أيضاً تطوير تقنيات خاصة في علم نقل الأجنة Embryo transfer والذي يمكن الإنسان من التدخل بصورة أكثر براعة في العملية التكاثرية وتطويرها لمصلحته في زيادة الإنتاج وتحسن النوع.

تمكن العلماء بنجاح من عزل بيوض الفئران وإخصابها في أنابيب الاختبار حتى بلغت مرحلة الكيسة الأريمية، زرعت بعدها في أرحام فئران مستلمة حتى موعد الولادة الطبيعي، وتمكن العلماء من استخدام مادة الكولجيسين Colchicine (الشكل 5 - 4) في إزالة أنوية الفئران. تعد مادة الكولجيسين التي عرف دورها في تثبيط تكوين المغزل خلال الانقسام الخلوي لأول مرة عام 1930 من القلويدات السامة شديدة المفعول يستخرج من نبات اللحلاح أو الزعفران الكاذب Colchicum.

وقد تمكن الصيدليان الفرنسيان الشهيران بيرتير وكوفتو من فصله من النبات عام 1820، يستخدم الكولسيميد Colcemide (N - deacetyl N - methyl Colchicine) في تثبيط التيوبولين وتكوين المغزل ويقيّد الانقسام الخيطي عند الطور الاستوائي والتركيز المناسب للكولجيسين يتم تحديده تجريبياً في كل حالة وهو فعال في مدى واسع من التراكيز ولمعظم خلايا اللبائن في المزارع النسيجية فإن التراكيز الفعالة تتراوح بين 5-10 مولار إلى 7-10 مولار.



الشكل (5 - 4): التركيب الكيميائي للكولجيسين

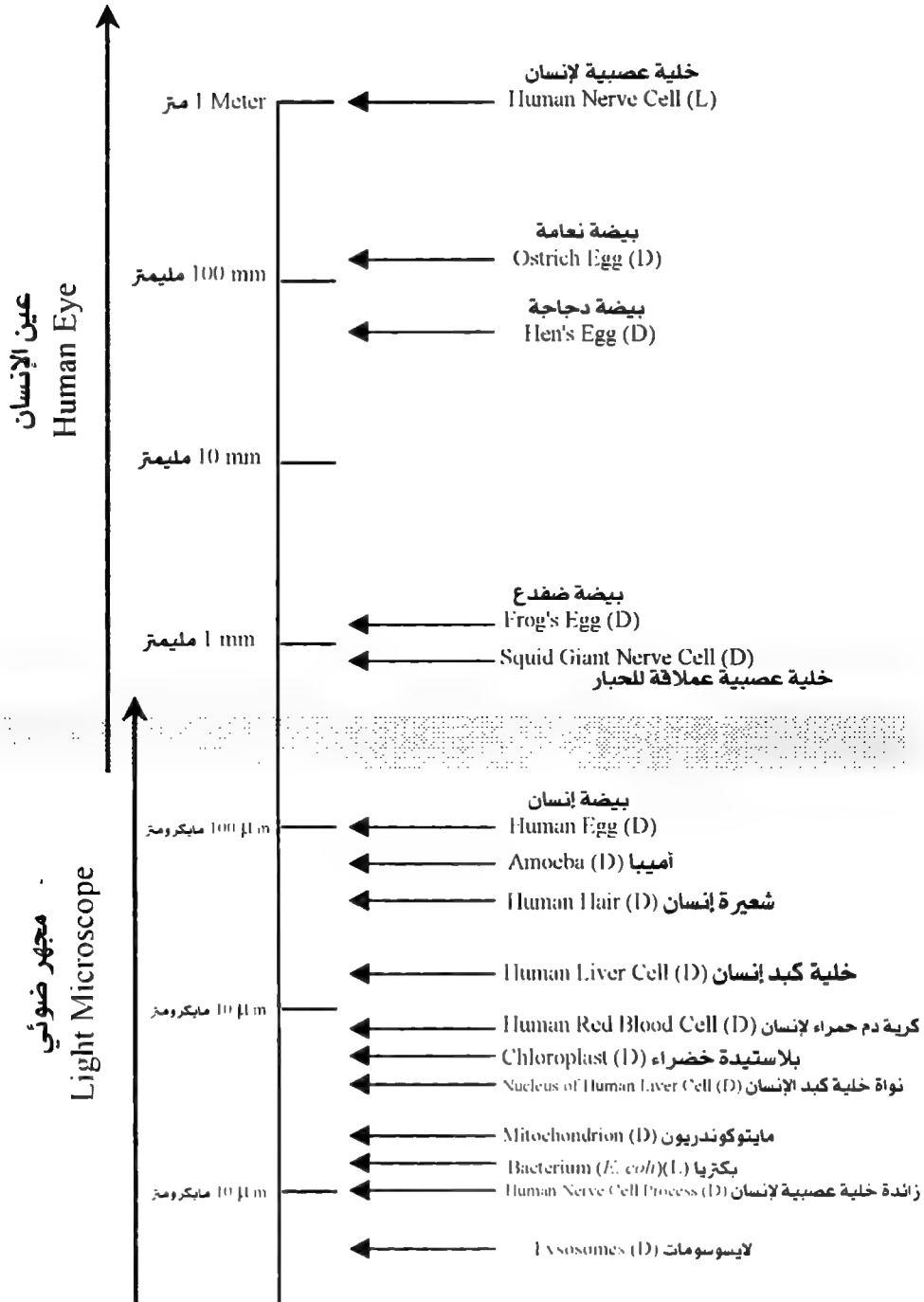
ومن الطرق الأخرى لإيلاج النواة الثنائية المجموعة الكروموسومية إلى البويضة الخالية من النواة هو عن طريق اتحاد الخلايا في المزرعة باستخدام بعض الفايروسات العائدة لمجموعة Paramyxovirus كفايروس سنداي Sendai Virus وهو الاسم المرادف لفايروس Parainfluenza murine Virus type I ويعزل من البويض المجننة Embryonated eggs وقد نجحت التجارب على الحيوانات غير العائدة لمجموعة الثدييات وعند إجرائها على الأخيرة واجهت العلماء بعض المشاكل والتعقيدات بسبب وجود الغلاف أو الغطاء الحامي للبيضة Zona Pellucida وهو غشاء مطاطي صلب وسميك يغلف البيضة، حيث وجد أن الخلايا الجسمية المتحدة بالبيض تنقسم عدة مرات ولكنها لا تنمو إلى كيسة أرمية بسبب وجود الغطاء الحامي للبيضة أنف الذكر. وقد بينت التجارب التي أجريت على الضفادع أن نجاح استئصال الضفادع كان يعتمد أساساً على زرع النوع الصحيح من الأنوية في خلية البيضة، إذ يجب أن تكون سرعة انقسام النواة الجديدة متناسبة مع السرعة الأصلية لانقسام خلية البيضة وعند عدم حدوث مثل هذا التناسب والتناسق فإن اختلاف سرعة الانقسام سوف ينتج كائنات حية مشوهة وغير كاملة، حيث من الضروري إيجاد تزامن أو (توافق) بين سايتوبلازم البيضة ونواة الخلية الجسمية، أي جعلهما تنقسمان بالسرعة نفسها، أذ تمتاز خلية البيضة بسرعة انقسامها، في حين تكون معظم الخلايا

حسمية أبطأ انقساماً من البيضة، و ينتج تحفيز أو تنشيط السايوتوبلازم لنواة الخلية الجسمية على الانقسام قبل أن تكون الأخيرة مهياًة للانقسام حدوث تكسر في الصبغيات (كروموسومات). ولتلافي هذه المشكلة يستخدم العلماء خلايا جسمية ذات أنوية أسرع انقساماً كالحلايا الجلدية أو الدموية أو خلايا الضرع.

وتمتاز ببويض الشدييات أيضاً بكونها أصغر حجماً (الشكل (5 - 5) وأسرع تلفة ويحتاج نقل وزرع الأنوية فيها من دون إتلافها إلى الحرص الشديد وإجراء العملية بالتطويع المجهري للخلايا. وقد تأكدت هذه الحقائق حين لم تحقق التجارب التي أجريت لاستئصال الأرناب نتائج مرضية، وقد نمت بعض الأجنة نمواً شاذاً.

تمكن العلماء منذ عدة سنوات من إنتاج فئران لها أربعة آباء وتم ذلك بأخذ الأجنة في طور الثماني خلايا من أبوين من فأرين مختلفين حاملين، وتربية تلك الأجنة في بيئة صناعية، فإذا دفعت إحدى تلك الأجنة للتصادم مع أخرى في ذات البيئة الصناعية فإنها تلتحم معها في جنين واحد، وبعد فترة أخرى من النمو يزرع هذا الجنين المتحد في أم حاضنة ويترك لينمو نمواً طبيعياً وتنشأ بعض خلايا كل عضو في هذا الجنين المبرقش أو الموزائيكي Mosaic من زوج من الآباء والبعض الآخر من الزوج الآخر من الآباء، ويعرف هذا الفأر بالفأر رباعي الوالدين.

وتمكن العلماء من تطوير تقنية زرع أو غرس الأنوية للحصول على نسل متماثلة ومتطابقة من الفئران (الشكل (5 - 6) يتم في هذا الأسلوب جمع الأكياس الأريمية (البلاستوسيت) من فأر مانح رمادي اللون وإزالة الغطاء الواقي وعزل كتلة الخلايا الداخلية (ICM) وفصل الخلايا وتفريقها وباستخدام تقنية الحقن النووي المجهري، يتم حقن إحدى هذه الخلايا في بيضة مخصبة يتم جمعها من فأرة مانحة سوداء اللون، تزال كلا الأنوية الأولية للبيضة المخصبة ولا يتم الإبقاء سوى على الخلية المنقولة، تنمي هذه البيضة الحاوية على الخلية المنقولة في وسط زرع خارج الحي حين وصولها إلى مرحلة البلاستوفور، تغرس بعدها في رحم فأرة مهياًة هرمونياً بيضاء اللون، حيث حصل العلماء على فئران رمادية اللون (اللون الأصلي للفأر المانح للخلية المنقولة).



الشكل (5 - 5): تتباين أحجام البويض وتختلف باختلاف النوع أكبرها للنعام وتكون بيضة الإنسان أصغر حجما وأسرع تلفا من الأنواع الأخرى.

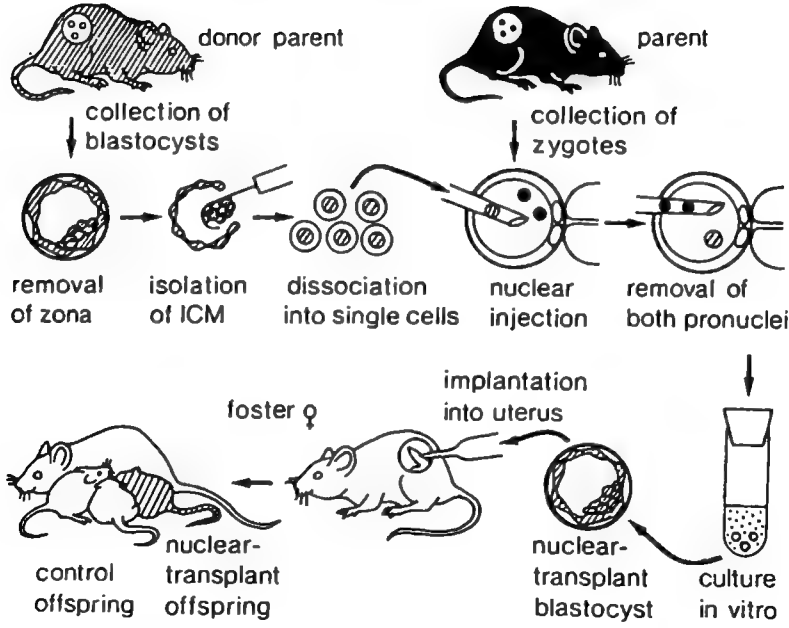


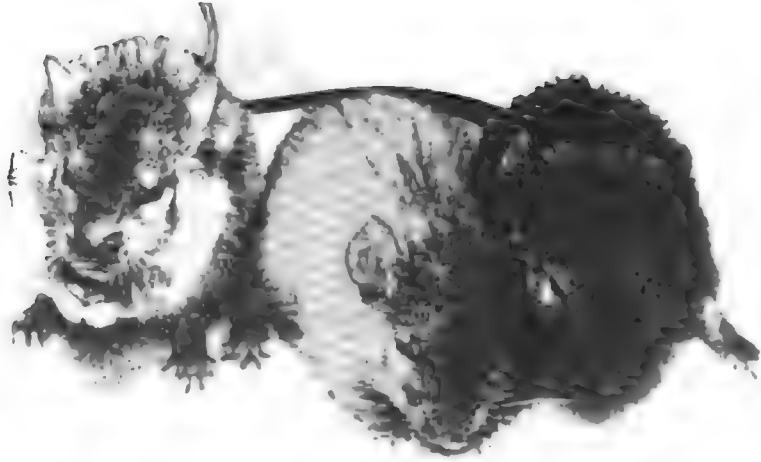
Diagram of the nuclear transplantation experiment

الشكل (5-6): مخطط يوضح تجربة زرع أو غرس الأنوية nuclear transplantation لإنتاج نسل متماثلة من الفئران.

ونجح الباحثان كارل المنسي وبيتر هوب في عام 1979 من إنتاج ثلاثة فئران بطريقة زرع الأنوية (الشكل 5 - 7).

وكان الفشل قد أصاب تجاربهما و لـ 363 مرة، ثم حالفهم النجاح بعد ذلك، وقد تمكن هذين الباحثين من إنتاج توائم وثلاثيات Triplets متماثلة بعد زرع أنوية من نفس المتبرع في عدة بويضات منزوعة الأنوية، ونجحوا في إنتاج نسل (كلونات) من الفئران.

قطعت التجارب المتعلقة بالفئران شوطاً كبيراً وذلك بسبب سهولة التطويع الوراثي لبيوض وأجنة الفئران، ولم يتحقق تقدم مماثل على صعيد الحيوانات الاقتصادية.

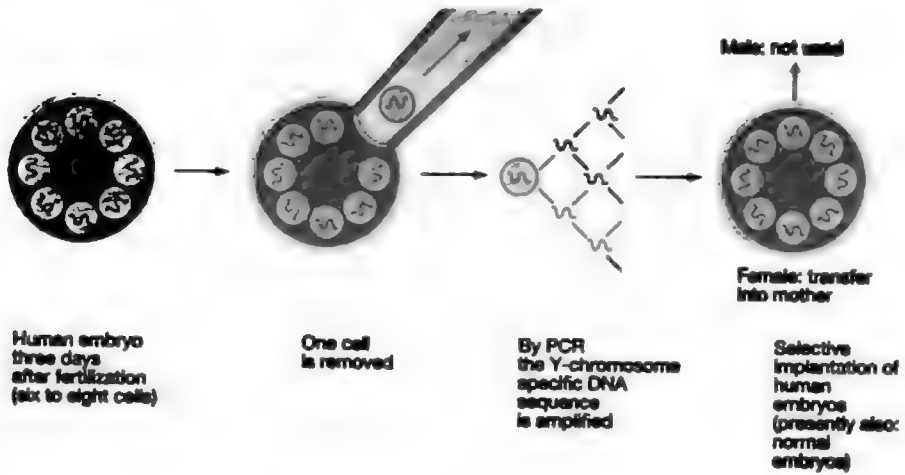


Three mice produced by nuclear transplantation

The three mice thus produced included two gray mice and one with the agouti color (right).

الشكل (5 - 7): ثلاثة فئران أنتجت بالنقل النووي من قبل العالم كارل المنسي والعالم بيتر هوب.

الاستئصال مصطلح يعني الحصول على (نسائل متطابقة تماما من الناحية الوراثية)، ويمكن للاستئصال أن يحدث بطريقتين أساسيتين: الأولى باستئصال الخلايا الجسمية المتخصصة، أما الثانية فتتم باستخدام طريقة الانشطار الجنيني وهو عملية اقتطاع مجموعة من الخلايا الجنينية من أجنة في الأطوار المبكرة من النمو الجنيني أحد الوسائل المهمة في الحصول على نسائل متطابقة تماما من حيث المحتوى الوراثي، وكذلك في تشخيص جنس الجنين وباستخدام تقنيات الهندسة الوراثية واعتمادا على الخلايا الجنينية المقتطعة من الجنين (الشكل (5 - 8)). وفي عام 1993 تحقق إنجاز كبير، وفي غاية الأهمية. إذ تمكن علماء الأجنة في جامعة واشنطن من استئصال أجنة بشرية، وذلك بأخذ خلايا من 17 جنين بشري، ومن كل من (2 - 8) خلايا متماثلة بالحجم ثم اقتطاعها من الأجنة، نمت كل خلية من الخلايا في طبق مختبري وحصلوا على أجنة من 32 خلية وهو الحجم الملائم الذي يمكن غرسه أو زرعه في رحم المرأة. وقد أثارت هذه التجربة ضجة إعلامية كبيرة وأثارت الكثير من الاعتراضات الأخلاقية والتي سوف يتم التطرق إليها بالتفصيل في الفصل الثامن.



(A)



(B)

الشكل (5 - 8):

A - التشخيص ما قبل الغرس يعتمد على إزالة أحد الخلايا الجنينية من الجنس البشري بعد مرور ثلاثة أيام من الإخصاب، حيث يتكون الجنين من 6 - 8 خلايا وباستخدام تقنية التفاعل السلسلي لأنزيم بلمرة الدنا PCR يتم تضخيم التعاقبات النوعية للكروموسوم الذكوري Y، حيث يمكن انتقاء الأجنة (ذكور أم إناث).

B - يمكن الحصول على توائم متعددة من جنس واحد بفضل التقنيات الحديثة لعلم الإخصاب والأجنة.

وفي عام 1993 تحقق إنجاز كبير، وفي غاية الأهمية. إذ تمكن علماء الأجنة في جامعة واشنطن من استئصال أجنة بشرية، وذلك بأخذ خلايا من 17 جنين بشري، ومن كل من (2 - 8) خلايا متماثلة بالحجم ثم اقتطاعها من الأجنة، نمت كل خلية من الخلايا في طبق مختبري وحصلوا على أجنة من 32 خلية وهو الحجم الملائم الذي يمكن غرسه أو زرعها في رحم المرأة. وقد أثارت هذه التجربة ضجة إعلامية كبيرة وأثارت الكثير من الاعتراضات الأخلاقية والتي سوف يتم التطرق إليها بالتفصيل في الفصل الثامن.

5 - 4 استئصال القروود ... الخطوة الأولى نحو استئصال البشر:

شكل الإعلان عن نجاح استئصال القروود من الخلايا الجنينية من قبل العالم دونالد وولف (Donald Wolf) من مركز أوريغون الإقليمي لبحوث الرئيسيات (الرئيسيات رتبة من الثدييات يعود لها الإنسان والقروود) Oregon Regional Primate Research Center خطوة جديدة متقدمة لتقنيات هندسة التكاثر الجديدة تجاه توفر إمكانيات القدرة الجامحة للإنتاج الجماعي للإنسان، وحقق هذا الإنجاز نقلة نوعية لتقنيات الاستئصال والتوأمة نحو عتبة جديدة غير مسبقة من النواحي العلمية والأخلاقية.

إن نجاح تجارب الاستئصال بالانشطار الجنيني جعل العالم في مواجهة نمط جديد من التقنيات التناسلية المستقبلية والتي تم تطبيقها بنجاح على مخلوق وكائن حي هو الأكثر قرباً للإنسان من أي حيوان آخر، حيث أنه أكثر قرباً من الماشية على سبيل المثال. وتمت عملية الاستئصال والحصول على توائم القروود المتطابقة وراثياً (الشكل 5 - 9) بالانشطار الجنيني لأجنة مؤلفة من ثمانين خلايا، وفي الحقيقة فإن التقنية بحد ذاتها لم تكن جديدة، إذ سبق وأن أجريت على الخراف والماشية والخنزير والأرانب، ولكن الحديد كان في تطبيقها على فصيلة حيوانية أكثر قرباً للإنسان، وتمهد تقنية الاستئصال المعروفة بـ (نقل الأنوية) الطريق نحو الإنتاج الجماعي للقروود المتماثلة وراثياً، وتكمن أهمية هذه النقطة بالذات في إمكانية إجراء التجارب والاختبارات على عدد محدود من حيوانات الاختبار المتماثلة وراثياً وضمان أن يكون التأثير هو للعقار المستخدم ولا علاقة له باختلافات الوراثة بين حيوان وآخر.



الشكل (5 - 9) " قردان تم استئصالهما بالانقطاع الجنيني في مركز أبحاث أوريغون وشكل هذا الحدث سابقة خطيرة نحو إمكانية الاستئصال البشري .

ونظراً لما تثيره هذه التجارب من إحياء وإغراءات قوية نحو استخدامها لاستئصال البشر فقد تم مناقشة النواحي العلمية والأخلاقية لهذا الموضوع المهم في الاجتماع الدولي لاستئصال (كلونة) اللبائن الذي عقد في شهر حزيران 1997 في أرلنغتون (Arlington) في ولاية فرجينيا، وحضره أكثر من 100 عالم من المهتمين بهذا الجانب .

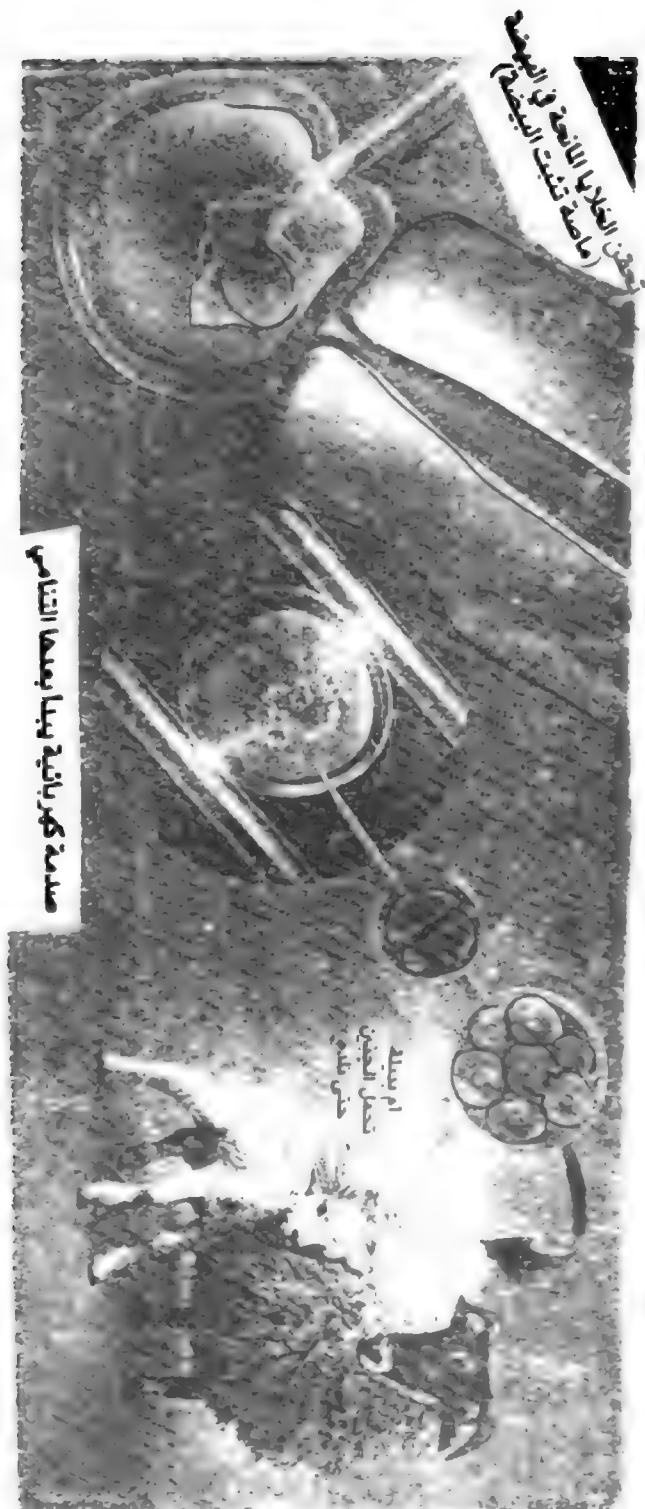
5 - استئصال ميكاف وموراف من خلايا مستزرعة:

كان استئصال النعجتين «ميكاف وموراف» من خلايا جنينية مستزرعة حدثاً بالغ الأهمية، وأثبت لأول مرة إمكانية الحصول على نسل حي (الشكل 5 - 10) من خلايا جنينية مستزرعة تم تضامها مع بويضات منزوعة النواة وباستخدام تقنية متطورة (الشكل 5 - 11 A, B)، ناجحة، وشملت التقنية مجموعة من المراحل شكلت الأساس الذي تم استخدامه في استئصال النعجة «دوللي» بعد ذلك بعامين فقط، وتضمنت الخطوة الأولى أخذ خلايا مفردة من جنين نعجة ملساء الوجه عمره تسعة أيام وتفريق خلاياه وتنمية الخلايا المفردة في مستنبت زرعى، وفي الوقت ذاته يتم أخذ خلية بيضة من نعجة سوداء الوجه وباستخدام ماصة دقيقة تتم إزالة الكروموسومات من خلية البيضة وتصبح خلية البيضة منزوعة النواة، تنقل بعدها الخلايا الجنينية المفردة النامية في المستنبت الزرعى إلى محلول مغذي مخفف، أما المرحلة الثانية فتتضمن تثبيت خلية البيضة منزوعة النواة باستخدام ماصة داعمة وحقن الخلية الجنينية المفردة النامية في المحلول المغذي المخفف باستخدام ماصة مجهرية إلى داخل خلية البويضة وتعريضها لاحقاً إلى صدمة كهربائية لتحفيز تنامي الخلية الجنينية، ينقل بعدها الجنين الناتج (6 - 8 خلايا) إلى أم بديلة (مرضع) سوداء الوجه لإكمال فترة الحمل والحصول على النسل أو الذرية المستنسلية الحية.



الشكل (5 - 10): ميكاف وموراف أول نعجتين مستنسلتين من خلايا مستزرعة.





الشكل (5 - 11) (B)

الفصل السادس

النقل النووي

6 - النقل النووي Nuclear Transfer

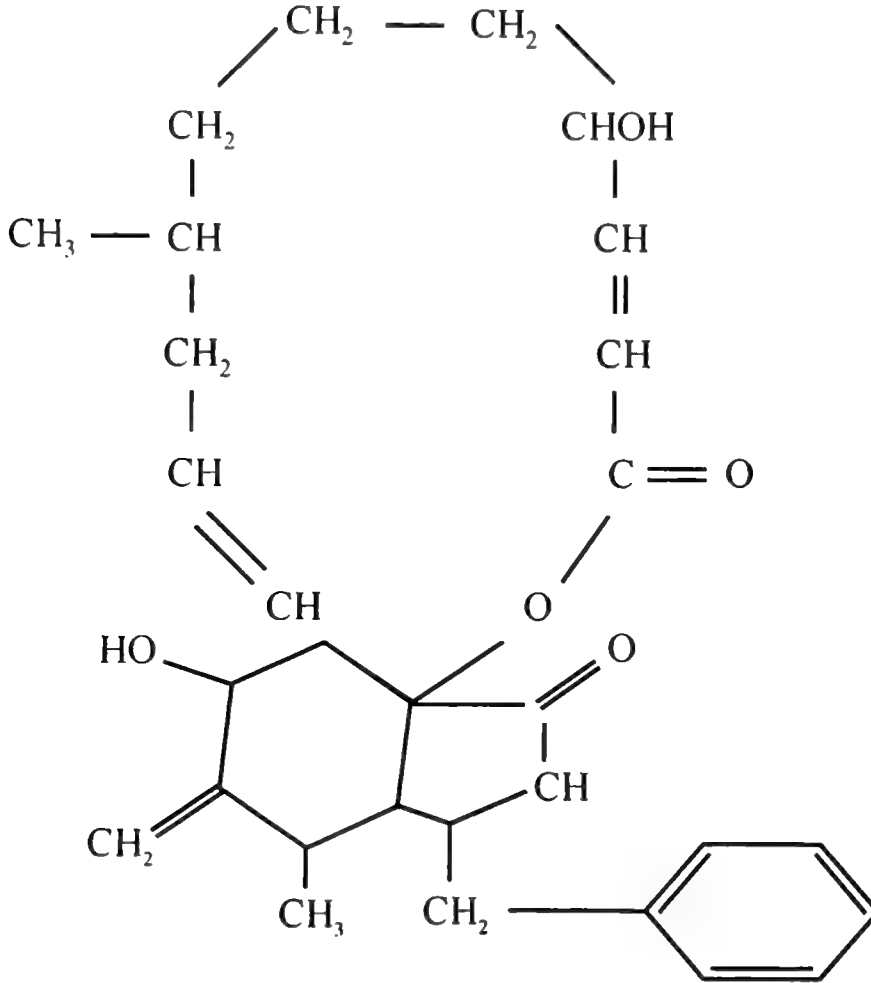
6 - 1 مقدمة عامة

يعد أسلوب النقل النووي واحداً من أهم أساليب هندسة التكاثر، أجريت معظم تجارب النقل النووي على اللبائن وعلى الفئران بشكل خاص، ويعتمد الأسلوب على شطر أو تنصيف البويضات ذات الخلية المفردة في وسط يحوي الساييتوكالاسين - B Cytochalasin (الشكل 6 - 1). والساييتوكالاسين عبارة عن مستقلبات فطرية، أوضح العالم الإنكليزي كارتر (S.B.Carter) في أواسط الستينيات بامتلاكها لعدد من التأثيرات الغريبة على سلوك الخلية، ومن هذه التأثيرات هو قدرتها إذا ما أضيفت بجرعات معينة على إيقاف الانقسام الخلوي أو إيقافه نهائياً، أما إذا أضيفت في جرعات أخرى فإنها تجعل ساييتوبلازم الخلية يطرد النواة إلى خارج الخلية، إذ تتحرك النواة نحو حافة الخلية مشكلة انتفاخاً في جدار الغشاء الساييتوبلازمي، بعد دقائق قليلة من تعرض الخلايا للمادة وتندفع النواة على أثرها إلى خارج الغشاء، وفي بعض الأحيان تبقى النواة متصلة بالخلية التي خرجت منها بخيط ساييتوبلازمي رفيع، ويمكن في الحقيقة عكس العملية وإعادة إدخال النواة إلى الخلية من جديد، حالما يتم وضع الخلية في وسط جديد خال من مادة الساييتوكالاسين، وأهمية هذه المادة العجيبة لا تقتصر على عملها كمشرط كيميائي حسب، بل إنها قادرة على إيقاف الانقسام الساييتوبلازمي إيقافاً تاماً دون أن يؤثر ذلك على انقسام النواة، وهذه الميزة (تساعد على تحقيق التزامن والتوقيت) بين البويضات والخلايا الجسمية.

وفي عام 1970 استخدمت مادة الساييتوكالاسين لطرد نوى أنواع مختلفة من خلايا اللبائن (الثدييات) دون أن تتأثر هذه الأنوية أو الساييتوبلازم المحيط بها، وتمكن الباحثون من إعادة ترتيب الخلايا المفككة باستخدام فايروس سندي (Sendai Virus) وكانت هذه المحاولة إشارة غاية في الوضوح نحو إمكانية استئصال الحيوانات الثديية.

تمتاز الخويطات المجهرية Microfilaments بحساسيتها العالية لهذه المادة السامة حيث تمزق الترتيب أو النظام المعتاد لهذه الخويطات، ولا تقتصر تأثيرات هذه المادة السامة على

الخويطات المجهرية حسب بل تؤثر على وظائف متعددة للخلية فهي تشبط وتؤثر على الحشوة الساييتوبلازمية (المطرق) Matrix وعلى الجريان الساييتوبلازمي، وعلى حركة الخلية وعلى استقطابها Polarity.



شكل (6 - 1): التركيب الكيميائي لمادة الساييتوكالاسين - ب Cytochalasin - B وتعني باللغة الإغريقية (مرخي الخلية).

استخدم أسلوب النقل النووي في الحيوانات الثديية كأداة قيمة في الدراسات الجنينية وكأسلوب لمضاعفة (أجنة النخبة أو الصفوة) Elite Embryos ، على الرغم من أن الذرية Offspring لم يتم تسجيلها إلا عند استخدام الأجنة المبكرة من متبرعات للأنوية .

6 - 2 تجارب النقل النووي في الخراف:

لم ينجح العلماء في تجارب النقل النووي في الخراف حتى بداية عقد الثمانينيات من ثقرن العشرين؁ وأجريت العديد من التجارب المبكرة في معهد (A.R.C) للفسلجة خيوانية في كامبردج. وفي عام 1981 بين الباحث ويلادسن (S.M.Willadsen) القدرة والإمكانية التطورية للقسيمات الأرومية المعزولة من أجنة خراف ذوات 4؁ 8 خلايا ومن بين 202 جنيناً تم نقلها؁ تمكن الباحث من استرداد 180 أي 89 % منها ومن هؤلاء الأجنة فإن 159 أي 88 % منها تمكنت من مواصلة النمو والتطور بمعدل طبيعي.

وتمكن الباحث نفسه (ويلادسن) في عام 1984 من تطوير أسلوب للنقل النووي إلى أجنة الخراف ويعد هذا الأسلوب الأول من نوعه في الخراف ونظراً لأهمية هذا الأسلوب فسوف نتطرق إليه بأسهاب؁ اعتمد المنهج التقني أو الأسلوب الجديد على جمع البيوض والأجنة من نعاج تعود للسلالة المنتجة (نعاج شيفوت X Cheviot خراف جيل ويلز Welsh Mountain) وفي اليوم (صفر) وقبل بضع ساعات من بداية أو مستهل دورة النزوة المتوقعة استلمت النعاج المتبرعة 500 وحدة دولية من هرمون موجهة القند المشيمائي البشري (Human Chorionic Gonadotropin (hCG داخل الوريد؁ وتم استعادة البيوض غير المخصبة من النعاج المتبرعة بعد 30 - 33 ساعة من تطبيق الجرعات الهرمونية؁ جمعت الأجنة ذوات الـ 8 و 16 خلية في اليوم الثالث والرابع على التوالي من النعاج المتبرعة الملقحة بالسائل المنوي لخراف السفولك Suffolk.

وأجريت عمليات الخزن والتطويع والنقل في وسط دارىء الفوسفات الملحي الإغنائي (PBS) وفي درجة حرارة الغرفة (20° م)؁ ثم استخدمت إبرة زجاجية دقيقة في عمل شق طولي واسع في الغشاء الواقي للبيضة (ZP) وفوق الجسم القطبي للبيضة غير المخصبة؁ ثم نقلت البيوض إلى محلول الدارىء الملحي (PBS) الحاوي على 5 مايكروغرام/مليتر من الساييتوكالاسين B (شركة سمكا)؁ وبعد مرور ساعة تم سحب الجسم القطبي وساييتوبلازم البيضة المجاور له (باستخدام ماصة دقيقة بقطر 30 مايكرومتر) وإزالته؁ وبهذه الطريقة يمكن لأغلب البويضات (90 % أو أكثر) أن تنقسم

إلى خليتين بغشاء خلوي سليم وكل منها يحتوي على نصف سايتوبلازم (هولي) البيضة Ooplasm تقريباً.

وأظهرت الدراسات الأولية، التي تم بها صبغ أنصاف خلايا البيضة بصبغة الأكردين البرتقالي Acridine Orang وفحصها بالمجهر المتألق 75 % من أنصاف البيوض والتي أزيلت مع الجسم القطبي تحوي كروموسومات الطور الاستوائي الثاني لخلية البيضة Oocyte Metaphase II Chromosomes «تسمى المرحلة الأولى من هذا الطور بالطور ما قبل الاستوائي (Metaphase) وهي تتبع مباشرة اختفاء غشاء النواة وفيه تتركز الكروموسومات في مركز الخلية ويكتمل تكون المغزل» أو تسمى هذه الأنصاف بالأنصاف النواة Nucleated Halfs في حين لا تحوي الأنصاف الأخرى لخلايا البيضة على تراكيب نووية وتسمى الأنصاف المفصوعة (مزالة النواة) Enucleated egg halves.

تم التطويع المجهري بإيلاج القسيمات الأرومية المفردة المعزولة من الأجنة ذوات الـ 8 و 16 خلية في الغطاء الواقى للبيضة (ZP) للأنصاف النواة والمفصوعة النواة على حد سواء، وباستخدام جهاز المطواع المجهري Micromanipulator واثان من المحاقن المجهرية De Fonbrune Microsyringes، ولغرض تحفيز اندماج الخلايا تم استخدام أسلوب الاندماج المحفز بفايروس السنداي Sendai Virus.

6 - 2 - 1 أسلوب الاندماج المحفز بفايروس السنداي:

يعتمد هذا الأسلوب على وضع القسيمات الأرومية في عالق من فايروسات السنداي غير الفعالة «بحدود 1000 وحدة تلازن دموي Haemoagglutination Unit لكل مليلتر من دارىء الفوسفات الملحي PBS والساييتوكالاسين ولمدة دقيقتين ومباشرة قبل إضافتها إلى أجزاء البيوض».

ويمكن تحفيز الاندماج باستخدام وسيلة غاية في الروعة والكفاءة وتعرف الطريقة بالاندماج الكهربائي (Electrofusion) (راجع الفقرة 3 - 2 - الفصل الثالث).

6 - 2 - 2 الاندماج الكهربائي:

يتم إجراء عملية التحفيز أو الاندماج الكهربائي بوضع الأغشية الواقية للبيضة الحاوية على القسم الأرومي وأنصاف البيوض في محلول يتكون من: 0.3 مولار كبريتات المغنيسيوم، و0.05 ملي مولار كلوريد الكالسيوم في الماء ولمدة 15 - 30 دقيقة، نقلت الأنصاف بعدها في نفس الوسط إلى حجرة الاندماج (الحاوية) لجهاز الاندماج الكهربائي، ويتم تعريضها لظروف الاندماج التالية:

600 KHz ، 6 فولت لمدة (5 - 10 ثواني) يعقبها ثلاثة نبضات اندماج 15 فولت (d.c) لمدة 0.1 مايكروثانية لكل منها وعلى فاصلة 0.1 ثانية بين الواحدة والأخرى، ثم تركت لمدة دقيقة واحدة بفولتية مقدارها (صفر) ثم تمت حضانة جميع الأجنة بدرجة حرارة 37 م° في محلول الـ (PBS) الحاوي على الساييتوكاليسين B، ثم وضعت الأجنة المدمجة في محلول (PBS) في درجة حرارة الغرفة وتم طمرها بالهلام ونقلت إلى أقنية البيض اللاحمة لنعاج في طور النزو وبعد أربعة أيام ونصف إلى خمسة أيام ونصف تم استردادها من النعاج وفحصها واختبارها. وتم نقل تلك التي تطورت إلى أكياس أرمية طبيعية التنظيم إلى نعاج مستلمات في اليوم السادس أو السابع من دورة النزو. أما بقية الأجنة فيمكن فحصها بالمجهر متباين الطور Phase - Contrast بعد تثبيت العينة في حامض الخليك/ إيثانول ونسبة 3:1 على التوالي وضعها بصبغة اللاكومويد Lacomoid في 40% من حامض الخليك.

إن النجاح اللاحق لعملية الاندماج سواء كان محفزاً بالفايروس أو كهربائياً يعتمد على إعادة برمجة الموروث، حيث من الأسهل إعادة البرمجة والموروث مفتوح وخاضع لعملية التضاعف، إذ أن سمة النتائج تتمثل في الاختلافات الوظيفية بين الموروث الذكري والموروث الأنثوي، والحاجة إلى كلا النوعين للتطور الناجح وهذا يمكن أن يعقد عملية إعادة برمجة الموروث بعد إتمام عملية النقل النووي.

تستعيد الخلايا المستخدمة كمتبرعات للنواة ما يكفي من الوسم الوظيفي لدعم التطور اللاحق، وهذا الاستنتاج تمخض عن كروموسوم X الأبوي لخلايا الفأر الجذعية

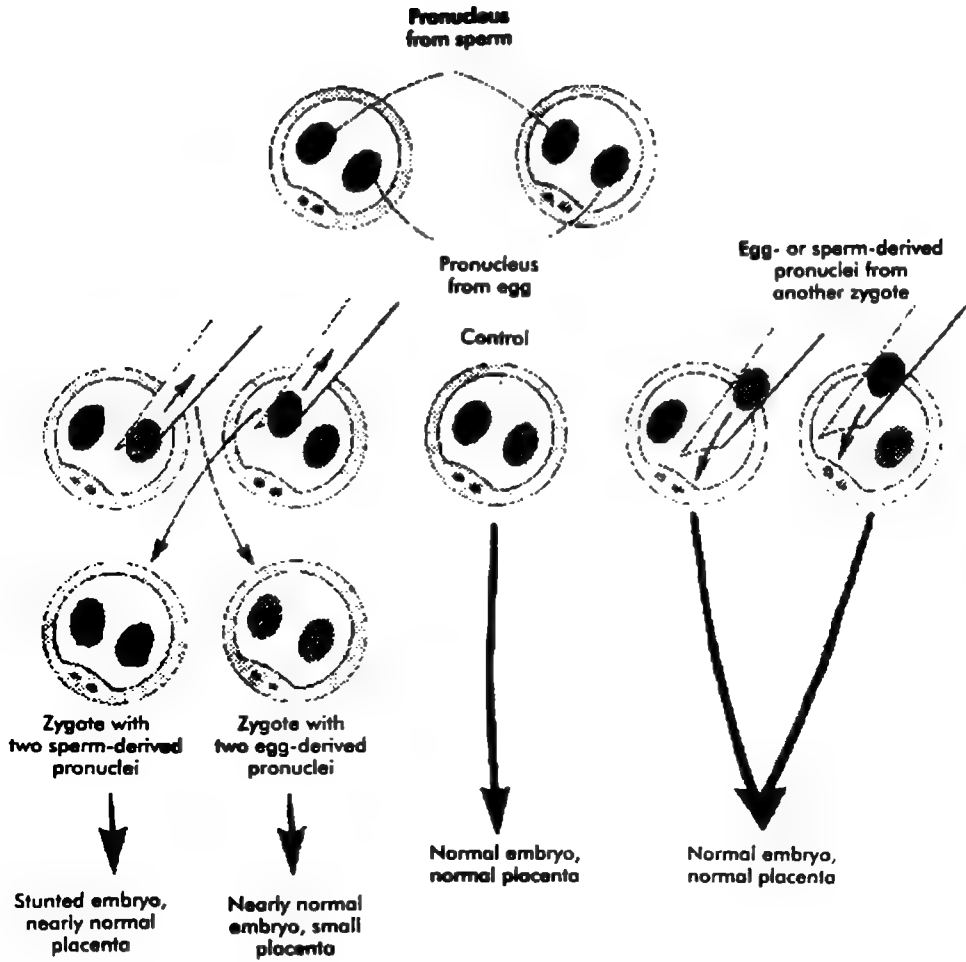
الجينية والذي يحتفظ بالبصمة أو الوصلة الضرورية لتأكيد التثبيط التفضيلي في الأغشية الجينية الخارجية وقد يتسبب فقدان الجزئي للبصمة أو الوصلة في الخلايا الجينية في الحصول على معدل واطئ لتطور الأجنة المطوعة وراثياً.

يعود اكتشاف عملية دمج الجينات Tagged Genes في الفئران إلى العام 1984 ولفت هذا الاكتشاف انتباه علماء الوراثة بحدود العام 1990 ومنذ ذلك الحين وجد الباحثون 15 من الجينات المدموغة Hallmark Genes في الفئران مع ما يلاحظها عند البشر.

توجد الجينات بصورة مزدوجة حيث يأتي أحد الجينين من الأب والآخر من الأم وكلاهما يكون نشطاً ولكن الجينات المدموغة تكون مختلفة تبعاً لكونها مورثة من الأم أو الأب فهي تحمل علامة بايو كيميائية تكشف عن مصدرها (الأبوي أو الأمومي) وبشكل ما يكون خاملاً عند مروره إما عبر البويضة أو عبر الحيوان المنوي.

إن طبيعة هذا الصمت الجيني غير معروفة وفي هذه العملية يتم تسكين الدنا (DNA) وذلك بتغطيته بمجاميع المثلل ويعتقد العلماء أن هذه المجاميع قد لا تكون الدفعة الرئيسية ولكن الدنا يعاني من تغيير أو تحول في بناءه وتركيبه مما يؤدي إلى حمل كل كروموسوم لعلامة معينة تشير إلى أنه آت من الأب أو الأم. وإن بعض الجينات المدموغة تنشط إذ كانت قادمة من قبل الأم. ونفس الجين يقف صامتاً إن كان موروثاً من الحيوان المنوي، وليس من البويضة وهناك جينات أخرى تعمل بصورة عكسية، أي أنها تنشط للعمل إن كانت مورثة من قبل الأب، ولا يقتصر الأمر على الكروموسومات الجنسية فقط.

وفي مرحلة معينة من دورة حياة كل كائن ثديي يتخلص الـ (DNA) من دمغاته الوراثة، مفسحاً المجال لجينات مدموغة جديدة. وبينت تجارب غرس الأنوية الأولية كيفية حدوث الوصلة أو الدمغ الأبوي (الشكل 6 - 2).



Parental imprinting by the use of pronuclear transplants.

الشكل (6 - 2) : الوسم أو الدمغ الأبوي باستخدام غرسات النوى الأولية .

وفي عام 1984 ، نجح الباحث (قاسم سوراني) مع اثنين من زملائه في جامعة كامبردج والذين عملوا في الكشف عن تطور الدماغ وسلوك الإنسان البدائي ونجحوا في إنتاج أنواع معينة من أجنة الفئران التي تحمل جينات الأم أو جينات الأب وكانت فكرة التجارب تهدف لاكتشاف سبب عدم قدرة الثدييات على التوالد العذري أو البكري أي من خلال بويضة غير ملقحة ، كما يحدث عند بعض الحشرات والنحل ، فإذا أخصب البويض يعطي إناثاً ، وإذا لم يخصب يعطي ذكوراً ، وقد انتهت تجارب الباحثين إلى

اكتشافهم وجود تلك الجينات المعينة. ومن أجل إنتاج أجنة تحمل جينات الأب فقط، نقلوا الدنا DNA من حيوانين منويين نحو بيضة فرغت من محتواها الوراثي. ومن أجل إنتاج جنين يحملان صفات أمه الوراثة فقط، قاموا بجمع الكروموسومات (المحتوى الوراثي) لبويضتين غير مخصبتين، وكان من المفترض أن تنمو الأجنة بشكل طبيعي لأنها تحمل العدد الكامل من الكروموسومات (أو نفس العدد من الجينات) $2n$ ولكن عند نقل الأجنة إلى رحم الفأرة، ماتت الأجنة التي كانت تحمل صفات وراثية من الأب فقط وكذلك الأجنة التي تحمل صفات وراثية من الأم فقط مما يعني أنه في كلتا الحالتين كانت هناك جينات حيوية لبقاء وتطور الأجنة لم يتم نقلها من الأم أو الأب على حد سواء إلى الأجنة.

إن الحقيقة المهمة التي تم اكتشافها من قبل الباحثين والمتعلقة بقدرة أجنة الفئران على إكمال مدة الحمل داخل أرحام فئران بديلة لأمهاتها طالما أن ما لا يقل عن نصف خلاياها كانت خلايا جنينية طبيعية (أي تملك جينات مشتركة من الأم والأب) أو بمعنى آخر هو عملية الجمع بين الأجنة الحاصلة على جينات من الأب أو الأم مع أجنة طبيعية، مما يؤدي إلى تكوين مزيج جنيني عرف باسم «الوهم» (illusion) ورغم أن الحجم الفعلي للجنين الناتج لم يكن هاماً لدى الباحثين، فإن الشيء الأهم لديهما كان في مراقبة ما حدث لذلك «الجنين الوهم» وللخلايا المأخوذة سواء من الأم أو الأب، وهي تنمو حتى تصبح جنيناً كاملاً. وكانت النتيجة محيرة حيث على الرغم من أن الأجنة أكملت فترة الحمل (ثلاثة أسابيع عند الفئران) الخاصة بها ولكنها لم تكن متشابهة فالأجنة التي زودت بجرعة مضاعفة من الجينات الأنثوية الأصل (من الأم) نمت لتغدو فئراناً برؤوس كبيرة و «أدمغة» مركبة على أجساد صغيرة، وفي المقابل، نمت الأجنة ذات الجرعات الإضافية من الجينات الأبوية الأصل (من الأب) حتى أصبحت ذات أجساد كبيرة ورؤوس صغيرة. ورغم أن الفئران الناتجة كانت غير طبيعية ولم تعيش طويلاً، فإنه تم الاستنتاج بأن الجينات الموروثة من الأم تعمل عند تنشيطها على تكوين أدمغة أكبر وبأن الجينات الموروثة من الأب تعمل عند تنشيطها على تكوين أجسام أكبر.

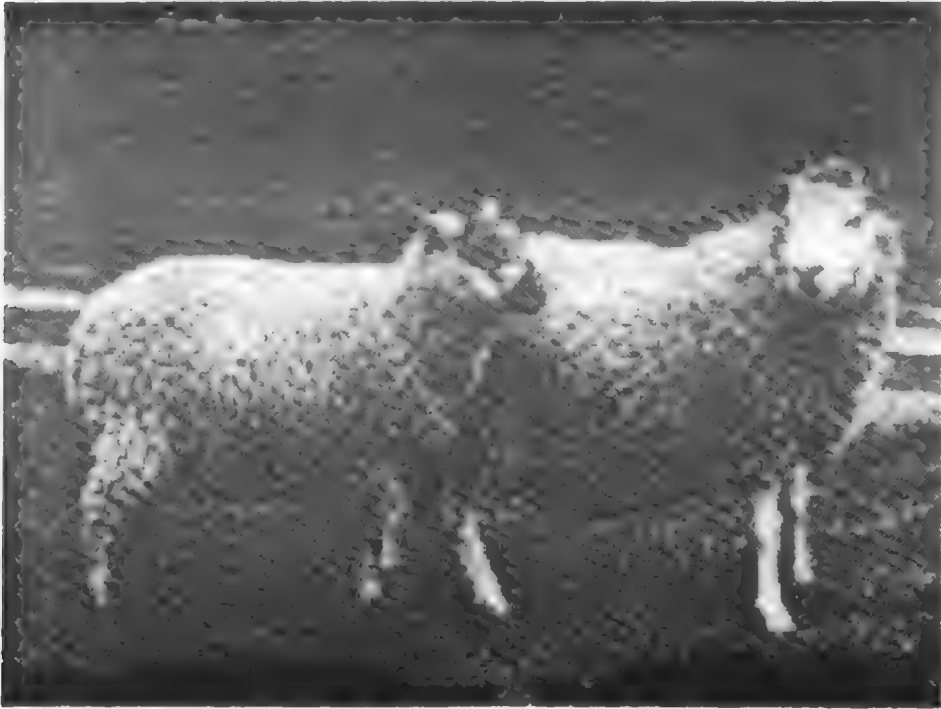
وبذلك استطاع الباحثين إثبات إن الجينات المدموغة التي تتحرك فقط في حالة قدومها من الأم لازمة للجنين في مراحل نموه الأولى، بينما تكون الجينات الموروثة من الأب دوماً الفاعل في إتمام عملية النمو الطبيعي للأنسجة التي تشكل المشيمة وإذا كانت هذه الجينات المدموغة تلعب أدواراً رئيسية مختلفة في الأيام الأولى من حياة الجنين فإنها ربما تلعب دوراً هاماً في مرحلة متقدمة من نمو الجنين ونمو الدماغ.

تتصرف الأجنة المعاد تكوينها وكأنها بيوض حاوية على النوى الأولية عوضاً عن تصرفها كقسمة أرومية مفردة من أجنة ذوات 8 أو 16 خلية. واحتمالية التطور اللاحق هي أكبر وأعظم في الكيسات الأريمية المنتجة في تجارب الاندماج الكهربائي والاندماج المحفز بفايروس سندياي منها في الشكل الحويصلي المتطور من القسمة الأريمية المفردة من الأجنة ذات الثماني خلايا والتي يمكن أن تتطور إلى حملان بنسبة أقل من 10 % وإن ثلاثاً من أربع كيسات أريمية باستخدام هذه التجارب (الاندماج) نقلت إلى نعاج متسلمة استطاعت البقاء إلى اكتمال فترة الحمل في موسم التكاثر (1983 - 1984) وإن جميع هذه الثلاث كيسات أريمية أنتجت من أجنة معاد تشكيلها (Reconstituted Embryos) وكانت جميع الحملان الثلاثة التي ولدت بعد انتهاء فترة الحمل تعود إلى سلالة (Suffolk cross bred) (الشكل 6 - 3) وكان اثنان منها - رثم متماثلة. وبذلك تم الحصول على عدد من حالات الحمل التي تحققت بعد نقل كيسات أريمية أنتجت بارتباط كيسات أرومية (blas tomeres) مفردة من أجنة ذات 16 خلية مع أنصاف بيوض متزوعة النواة (Enucleated egg halves) فإن ثلاثة نعاج كل منها استلمت كيستان أريمية من مجموعة تحوي ستة أقسام من ذات الجنين ذو الـ 16 خلية قتلت في اليوم الستين (60) وكل من الثلاثة نعاج المستلمة وجد أنها تحمل واحداً من الأجنة الطبيعية.

وأثبتت تجارب «ويلادسن» بأن أجنة كاملة الحوية يمكن الحصول عليها بارتباط نواة من قسمة أرومية مكونة من 8 خلايا مع تقريباً نصف السايروبلازم خلوية البيضة غير المخصبة والأكثر من ذلك فإن النتائج تشير بقوة إلى أنه حتى في حالة الأجنة ذوات الـ 16 خلية فإن نواة القسم الأرومي تبقى وافرة الجهد أو الفعالية (totipotent) وقد تسمى

بشاملة الوسع أي تملك القدرة على توجيه تمايز الخلايا إلى الأنواع المختلفة المشكلة للكائن الحي الناضج .

إن الهدف الواضح لهذه التجارب هو لتوصيف الظروف المثلى للتجارب اللاحقة المتعلقة بزرع الأنوية والاستنساخ واسع النطاق (Large - Scale Cloning) للحيوانات الاقتصادية الداجنة (Domestic Animal) وأخيراً فإنه بالإمكان الحصول على كيس أرمي (بلاستوسيت) من قسيم أرومي (بلاستومير) ناتج عن انشطار أجنة معاد تشكيلها والذي يعتبر بدوره واهب النواة (nucleus donor).



الشكل (6 - 3): خراف مهجنة نوع سفولك (Suffolk) انتجت بدمج قسيم أرومي مفرد من جنين ذو ثمان خلايا نوع (سفولك) مع نصف خلية بيضة غير ملقحة منزوعة النواة نوع (ويلش - شيفوت) والأجنة ذوات الثمان خلايا التي استخدمت كمتبرعات للأنوية كانت محفوظة بالتجميد العميق لمدة تزيد عن أربع سنوات .

6 - 2 - 3 خطوط الخلايا الجنينية :

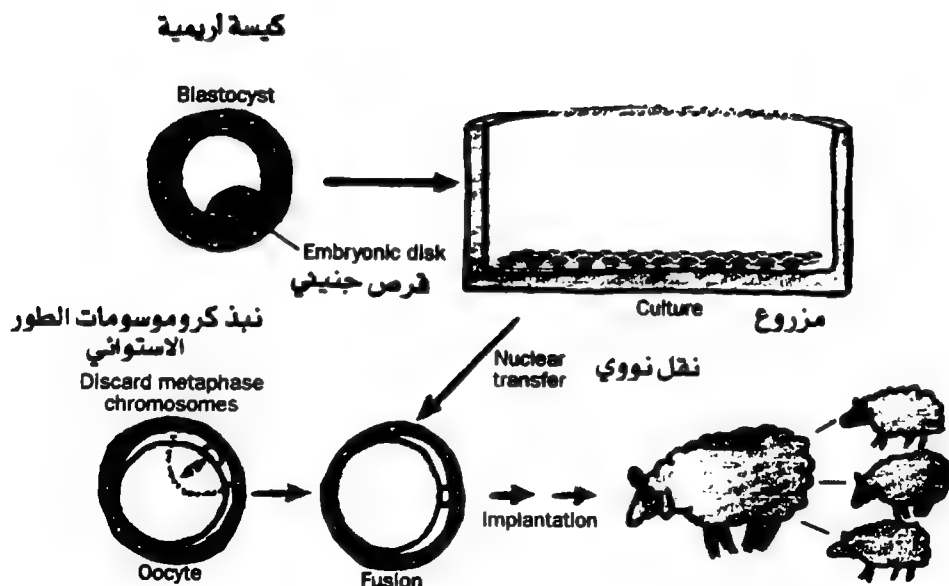
تعود أول إشارة إلى إنتاج ذرية حية لحيوانات لبونة باستخدام تقنية النقل النووي من خط من الخلايا الجنينية إلى العالم (كامبل) والذي نشر نتائج أبحاثه في مجلة الطبيعة في شهر آذار من عام 1996، إذ نجح كامبل في تنمية خط من الخلايا الجنينية زرعت لـ 6 - 13 نقلة (Passage) وتم تحفيزها للدخول في حالة الهمود (السكون) Quiescence باستخدام أسلوب التجويع بالمصل (Serum Starvation) وذلك قبل نقل نوى هذه الخلايا إلى خلايا البيوض مزالة الأنوية ومن الضروري التأكيد على أن تحفيز الخلايا المتبرعة للدخول في حالة الهمود والسكون يمكن أن يعمل على تحويل تركيب الكروماتين (الصبغيين) للخلية الواهبة مما يسمح بإعادة البرمجة النووية وإلى مراحل التطور اللاحق ويسمح هذا المنهج التقني للباحث بإمكانية تحليل وتحويل وظيفة المورثات في حيوانات الماشية. يعتمد الأسلوب على عزل الخلايا بالتشريح المجهرى Microdissection وازدراع Explantation القرص الجنيني (ED) Embryonic disc في اليوم التاسع في الحي، حيث تم تأسيس الخط الخلوي من النقلات المبكرة للخلايا الجذعية الجنينية (ES)، وتتخذ الخلايا مظهر الخلايا الظهارية Epithelial وذات مظهر مسطح Flattened والتي تتم إدامتها في أوساط زرعية إضافية ولـ (25 نقلة إضافية على الأقل) وأطلق على هذا الخط الخلوي من الخلايا الظهارية المشتقة من الجنين بالمصطلح TNT وتعني Totipotent Nuclear Transfer .

هذا ويعتمد تطور الأجنة المعاد تكوينها (Reconstructed) باستخدام تقنية النقل النووي على التداخلات بين النواة الواهبة والعوامل الأنزيمية في سايتوبلازم الخلية، ومن أهم هذه العوامل هو فعالية أنزيم الكايناز السايوبلازمي Cytoplasmic Kinase ، العامل المحفز للنضوج (MPF) Maturation/mitosis/meiosis Promoting Factor ، من الضروري الإشارة إلى إمكانية تعرض الأجنة المعاد تكوينها أو تشكيلها إلى الضرر أو التلف الكروموسومي وحصول اختلال في الصيغة الصبغية Aneuploidy، إذ تخضع النواة المنقولة بوجود مستوى عالي من (MPF) إلى انحلال الغشاء النووي وتكثيف الكروموسومات، ويمكن الحد من تأثير الضرر الحاصل بنقل الأنوية بعد اختفاء واضمحلال فعالية العامل المحفز للنضوج والانشطار الخلوي (MPF) وذلك باستخدام

أسلوب التنشيط المسبق لخلايا البيضة مفصوعة النواة المقيدة في الطور الاستوائي الثاني، أما الوسيلة الأخرى لتلافي الضرر أو التلف الناتج عن فعالية الـ (MPF) فتتمثل في نقل الأنوية الضعفانية (ثنائية المجموعة الكروموسومية) Diptoidnuclei إلى خلايا البيضة في التالي (الاستوائي)، حيث تسمح جاهزية خلايا TNT لهذا الأسلوب بالاستخدام.

6 - 2 - 3 - 1 الأسلوب المستخدم للحصول على الخطوط الخلوية:

تؤخذ مجموعة من 4 - 6 أقرص جنينية (Ed) والتي يمكن الحصول عليها بالتشريح المجهرى للخلايا وتزرع على طبقات مغذية Feeder Layers مكونة من أرومات ليفية Fibroblasts فأرية أو جردية مثبطة التفتل (الانقسام المائتوزي) في وسط (GIBCO) Dulbeccos Modified Eagles Medium الحاوي على 10 % FCS و 10 % من مصل الوليد Newborn Serum والمضاف إليه العامل المثبط لابيضاخ الدم ذو التركيبة الوراثي الجديد (LIF) Recombinant Human Leukaemia Inhibition Factor وبعد 5 - 7 أيام من الزرع يتم معاملة الأقرص الممدودة (المنشورة مع الترسين، تمر بعدها وتنقل إلى أوساط مغذية جديدة، وبذلك يمكن الحصول على خطوط خلوية متماثلة، يتم بعدها عزل وتنقية دنا الموروث (المجين) وإجراء تفاعل التضخيم (التفاعل السلسلي لأنزيم بلمرة الدنا) PCR للتوابع المجهرية Microsatellite لغرض التأكد من أن الخلايا تعود إلى مجموعة سكانية ناشئة من خلية واحدة Single cell population أما الباحث كامبل (Campbell) وجماعته فقد استخدم أسلوباً رائعاً في تقنية النقل النووي، إذ أخذ قرصاً جنينياً من الكيسة الأريمية (الشكل 6 - 4) ونميت في مزرعة نسيجية جنينية وعلى طبقة مغذية، والحصول على خطوط دائمية من الخلايا، لقحت هذه الخلايا الجنينية في خلية البيضة المستلمة، بعد إزالة جزء صغير من سايتوبلازم خلية البيضة الذي يحتوي الصفيحة الاستوائية (نبد الكروموسومات)، حيث تتم عملية النقل النووي باندماج خلية جنينية مفردة تعود لخط الخلايا شاملة الوسع Totipotent ومن ثم تتم عملية زرع وغرس الجنين الناتج في نعجة مستلمة مؤقتاً، يتم بعد ذلك تقييم وتحديد حالتها بعد سبعة أيام، ثم يتم إعادة زرع وغرس الأكياس الأريمية والتويئات Morulas في نعجة أخرى لحين الولادة.



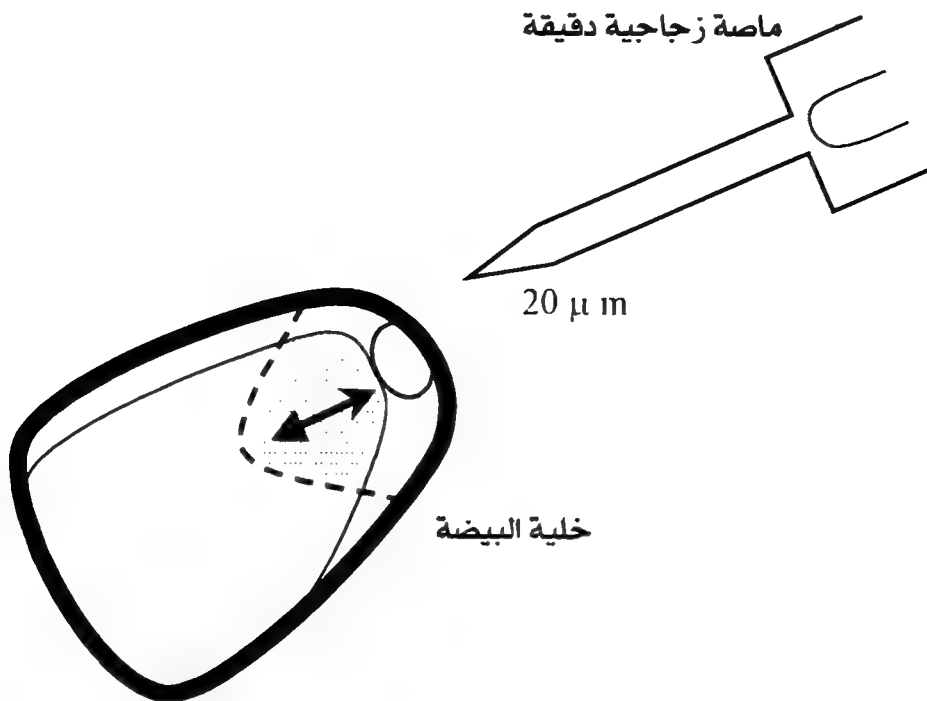
الشكل (6 - 4): تقنية النقل النووي المعتمدة على الخلايا المزروعة من الأقراص الجنينية والمطورة من قبل الباحث كامبل (Campbell).

إن روعة هذه التقنية تتمثل في حقيقة أنه متى ما تم الحصول على خط من الخلايا شاملة الوسع (وافرة الفعالية) وهي خلايا غير متميزة يمكنها التمايز إلى مختلف أنواع الخلايا المكونة للكائن الحي الكامل، فإنه لن تكون هناك حدود للتغيير الوراثي الذي يمكن أن يستمر في كل الاتجاهات مثل الحصول على سلالات من الخراف المبرمجة والمحورة وراثياً والإنتاج واسع النطاق للحيوانات الاقتصادية.

4.2.6 إعادة بناء وتشكيل الأجنة : Embryo Reconstruction

من أجل إعادة بناء وتشكيل الأجنة، توضع خلايا البيضة الواهبة في وسط حاوي على الكالسيوم الخالي من M_2 (Calcium - Free M_2) الحاوي على 10 % FCS مصّل العجل الجنيني و 7.5 مايكروغرام/مليتر من الساييتوكالاسين B و 5 مايكروغرام/مليتر هويشت 33342 (Hoechst 33342) (سكما) (في 37°م) لمدة 20 دقيقة للشطف

Aspirate ، وباستخدام ماصة زجاجية دقيقة بقطر لا يزيد عن 20 مايكرومتر تتم إزالة كمية صغيرة من السايروبلازم المتضمن في الغشاء البلازمي مباشرة تحت الجسم القطبي الأول (1 st Polar body) (الشكل 6 - 5) وتم التأكد من فصع وإزالة النواة من خلال تعريض البروتوبلاست النووي Karyoplast إلى الأشعة فوق البنفسجية والتحرري عن وجود الصفيحة الاستوائية، وبعد 34 - 36 ساعة من الحقن بالهرمون المحرر للكونادوتروبين Gonadotropin - releasing Hormone (GnRH) ، يتم تنشيط خلايا البيوض منزوعة النوى، حيث يتم زرع هذه الخلايا لمدة 4 - 6 ساعات في وسط TC 199 (الجدول 6 - 1) و 10 % مصّل العجل الجنيني FCS، إذ يتم دمج خلية مفردة وباستخدام وسط التنشيط والاندماج المكون من: 0.3 مولار مانيتول و 0.1 ملي مولار كبريتات المغنيسيوم و 0.0005 ملي مولار كلوريد الكالسيوم.



الشكل (6 - 5) : إزالة جزء صغير من السايروبلازم (المنطقة المضللة) باستخدام ماصة زجاجية دقيقة .

الجدول (6 - 1): مكونات وسط TC 199

MEDIA

TC MEDIUM 199

Code 5477

MORGAN & MORTON MEDIUM 150

Ingredients per liter

L - Arginine	70 mg	Calcium Pantothenate	0.01mg
L - Histidine	20mg	Biotin	0.01mg
L - Lysine	70mg	Folic Acid	0.01mg
L - Tyrosine	40mg	Cholin	0.5mg
DL-Tryptophane	20mg	Inositol	0.05mg
DL- Phenylalanine	50mg	P-Aminobenzoic Acid	0.05mg
L- Cystine	20mg	Vitamin A	0.1mg
DL- Methionine	30mg	Calciferol	0.1mg
DL-Serine	50mg	Menadione	0.01mg
DL- Theronine	60mg	α -Tocopherol Phosphate	0.01mg
DL-Leucine	120mg	Ascorbic Acid	0.05mg
DL-Isoleucine	40mg	Glutathione	0.05mg
DL- Valine	50mg	Cholesterol	0.2mg
DL - Glutamic Acid	150mg	L-Glutamine	100mg
DL - Aspartic Acid	60mg	Adenosinetriphosphate	1mg
DL - Alanine	50mg	Adenylic Acid	0.2mg
L - Proline	40mg	Ribose	0.5mg
L - Hydroxproline	10mg	Desoxyribose	0.5mg
Glycine	50mg	Bacto - Dextrose	1000mg
L - Cysteine	0.1mg	Tween 80	5mg
Adenine	10mg	Sodium Acetate	50mg
Guanine	0.3mg	Iron (as Ferric Nitrate)	0.1mg
Xanthine	0.3mg	Sodium Chloride	8000mg
Hypoxanthine	0.3mg	potassium Chloride	400mg
Thymine	0.3mg	Calcium Chloride	140mg
Uracil	0.3mg	Magnesium Sulfate	200mg
Thiamine Hydrochloride	0.01mg	Disodium Phosphate	60mg
Riboflavin	0.01mg	Monopotassium Phosphate	60mg
Pyridoxine Hydrochloride	0.025 mg	Sodium Bicarbonat	350 mg
Pyridoxal Hydrochloride	0.025mg	Bacto-Phenol Red	20mg
Niacin	0.025mg	Carbon Dioxide	
Niacinamide	0.025mg		

6 - 2 - 4 - 1 التحفيز الكهربائي (التنشيط والاندماج)

تستخدم نبضة مفردة من التيار المستمر (DC) مقدارها 1.25 كيلوفولت/سم لمدة 80 مايكروثانية لغرض التنشيط، أما لغرض الاندماج فتستخدم نبضة من التيار المتناوب (AC) مقدارها 3 فولت لمدة 5 ثواني يعقبها ثلاثة نبضات من التيار المستمر مقدار كل منها 1.25 كيلوفولت/سم لمدة 80 مايكروثانية. تزرع بعدها جميع أزواج (الخلايا الواهبة/خلايا البيض المستلمة) في وسط TC 199 و 10 % FCS و 7.5 مايكروغرام/مليتر سايتوكالاسين B لمدة ساعة واحدة عقب تطبيق نبضات الاندماج، تنقل بعدها إلى نفس الوسط ولكن بدون مادة السايتوكالاسين لحين نقلها إلى النعاج المستلمة.

6 - 2 - 5 إعادة البرمجة الوظيفية ودورة الخلية

6 - 2 - 5 - 1 متطلبات إعادة البرمجة:

يعتمد النقل النووي الفعال أساساً على عملية إعادة البرمجة Reprograming الوظيفية الفعالة الملائمة والكافية للنواة الواهبة. إذ تخزن الجزيئات الحيوية الكبيرة كالرنا المرسال m-RNA والبروتينات في سايتوبلازم خلية البيضة ويدعم هذا الخزين عملية التطور لفترة قصيرة نسبياً (يتم تحديدها من خلال حساب عدد الانقسامات الخلوية)، وكلما كانت هذه الفترة أقصر كلما تطلبت عملية إعادة البرمجة زمناً أقصر، وحيث أن الأجنة تتعرض للمزيد من التغيرات خلال مراحل النمو والتطور، فإن الخلايا من الأجنة الأكبر Older Embryos سوف تتطلب وقتاً أطول لإعادة البرمجة وأرجحية في عدم اكتمال عملية إعادة البرمجة، وقد تم معرفة مجموعة من الحقائق المتعلقة بمتطلبات إعادة البرمجة الكفوءة والتي تشمل:

- 1 - ضرورة وجود كمية من الرنا المرسال والبروتين في خلية البيضة.
- 2 - ضرورة التعامل مع خلايا جنينية (خلايا شاملة الوسع، وافرة الفعالية) أو قسائم أرومية حديثة الجمع ومبكرة لغرض زيادة كفاءة عملية إعادة البرمجة.

3 - ضرورة وجود توافق Compatibility بين سايتوبلازم خلية البيضة المستلمة والنواة الواهة (تتطلب هذه النقطة إجراء دراسات مكثفة لتحديد واستجلاء غموضها).

تشير المعلومات المتاحة حالياً إلى وجود عاملين يجب توفرهما على الأقل لتحقيق عملية نقل نووي ناجحة:

العامل الأول: بينت التجارب أن استخدام الخلية البيضية الناضجة Oocyte (وهي الخلية التي تنقسم انقساماً اختزالياً لتكوين خلية البويضة) هو أفضل من استخدام الزايكوت Zygote (بويضة مخصبة: خلية تتكون من اتحاد خليتين جنسيتين ناضجتين خلال عملية التكاثر الجنسي) وهذه الأفضلية قد تعود إلى ما تتطلبه خلية البيضة من وقت أطول لعملية إعادة البرمجة مقارنة بالزايكوت، أو لسبب ما يتعلق بأفضلية سايتوبلازم البيضة عنه في سايتوبلازم الزايكوت بالنسبة لعملية إعادة البرمجة. ومن هذه العوامل على سبيل المثال لا الحصر العوامل الساييتوبلازمية الضرورية لتنشيط الموروث ولإعادة نمذجة التضاعف Remodelling of Replication الكروموسومي والتي ينخفض مستواها أو تركيزها بعد الإخصاب بسبب ارتباطها بالدنا المتضاعف أو بسبب التحلل المعتمد على الوقت Time Dependent Degradation.

ولغرض حسم الجدال الدائر حول تأثير العوامل الساييتوبلازمية في تطور ونشوء الأجنة معادة التشكيل والتكوين من خلال تأثيرها في عملية إعادة برمجة التعبير الجيني والذي من المحتمل أن يتعزز بوساطة إطالة أمد أو فترة التعرض لهذه العوامل، ولكل الأسباب المعروضة أعلاه أجرى الباحث «كامبل» وجماعته في العام 1996 تجربة لدراسة وتعيين أهمية هذه التأثيرات من خلال دمج الخلية الواهة مع خلية البيضة في ظروف مختلفة شملت:

- 1 - إجراء عملية الاندماج قبل 4 - 8 ساعات من التنشيط (Post - Activation).
- 2 - إجراء عملية الاندماج والتنشيط في وقت واحد Fusion and Activation.
- 3 - التنشيط المسبق لخلية البيضة Preactivation.

6 - 2 - 5 - 2 الأسلوب المستخدم في الدراسة (داخل الحي)

يتم جمع خلايا البيوض بعد 28 - 33 ساعة من حقن هرمون (GnRH) المحور للكونادوتروبين ويستخدم محلول داريء الفوسفات PBS الحاوي على 1.0 % FCS والخالي من الكالسيوم والمغنيسيوم في عملية استرداد البيوض وغسلها بالماء الدافق. تنقل بعدها البيوض المستردة إلى وسط M_2 الخالي من الكالسيوم والحوي على 10 % من FCS وتحفظ بدرجة حرارة 37°م في 5% ثاني أكسيد الكربون، ويتم نزع (فصع) النواة وإعادة بناء وتشكيل الأجنة، وبعد مرور 50 - 54 ساعة من الحقن بالهرمون (GnRH) تظمر بعدها الأجنة المعاد بناءها في الهلام وتنقل إلى قناة البيض في النعاج المستلمة، وبعد 6 أيام يتم استرداد الأجنة ومتابعة التطور باستخدام المجهر.

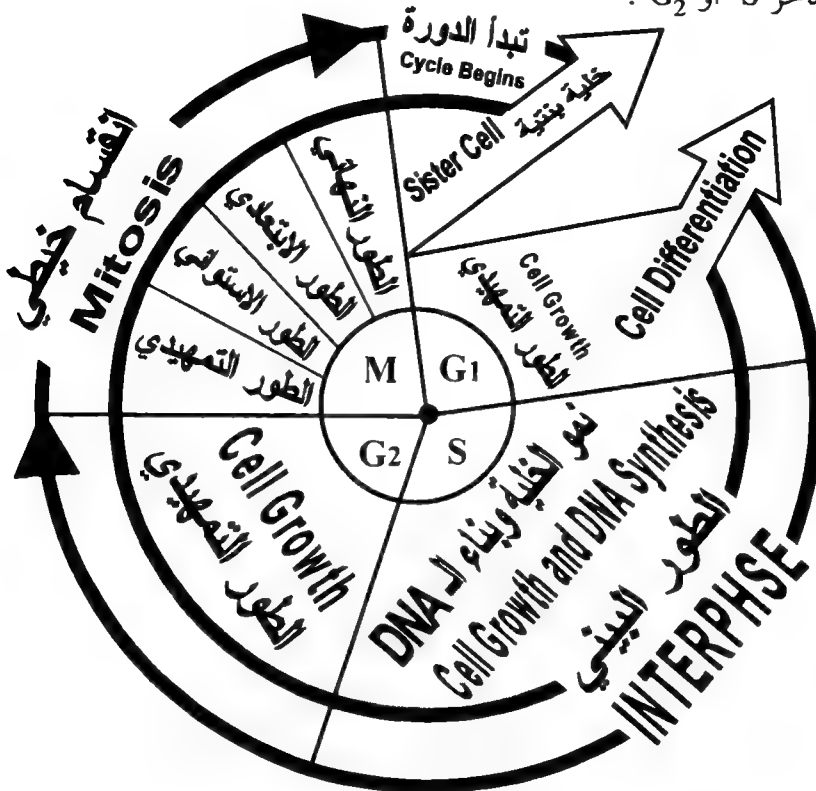
ولغرض حث الخلايا على دخول حالة السكون والهمود quiescent حيث يتم تنمية الخلايا الجنينية (شاملة الوسع) في طبقات مغذية وفي دوارق حاوية على وسط Dulbec cos Modified Eagles Medium (GIBCo) وتزرع لمدة يومين، يغسل بعدها المزروع شبه المتلاقى (المندمج) Semiconfluent في الطور الأسّي ثلاث مرات في وسط حاوي على 5. % (FCS)، وزرعت الخلايا في هذا الوسط ذو التركيز الواطئ من المصل لمدة 5 أيام ويتم إعادة تكوين الأجنة باستخدام السايوبلاست مسبقة التنشيط أو الفعالية. أما بالنسبة لحالة ما بعد التنشيط Post Activation فإن البروتوكول يتضمن دمج خلية مفردة مع خلية السايوبلاست بعد نزع النواة مباشرة في وسط حاوي على 0.3 مولاري مانيتول وبدون كالسيوم أو مغنيسيوم (لمنع التنشيط)، يتم غسل وزرع الخلايا المدمجة في وسط M_2 الخالي من الكالسيوم و 10% FCS وتحضن بدرجة حرارة 37°م وبوجود 5 % CO_2 لمدة 4 - 8 ساعات وقبل التنشيط بنصف ساعة، نقلت المزدوجات (الخلايا المدمجة) إلى وسط M_2 و 10% FCS والحوي على 5 مايكرومول من النوكودازول Nocodazole (من شركة سكما) وعقب التنشيط فإن الزايكوت المعاد تكوينها تحضن في وسط TC 199 بوجود 10% FCS و 5 مايكرومول نوكودازول ولمدة ثلاث ساعات إضافية. أما البروتوكول الأخير وهو التنشيط المسبق Preactivation وفيه تم دمج خلية مفردة مع خلية البيضة منزوعة النواة وبعد مرور 34 - 36 ساعة من تطبيق جرعات الـ GnRH وتستخدم

عس النبضة الكهربائية لتنشيط خلية السايروبلاست إضافة إلى الخلية الواهة، هذا ولم
تلاحظ فروق معنوية في تكرار التطور للنقلات الواطة العدد أو العالفة للخلية الواهة أو
مروق معنوية في نمط الخلايا منزوعة النواة المستلمة.

ومن الجدير بالذكر أن جميع الأجنة التي تتطور إلى مرحلة التوتة/ الكيس الأرمي
يجب أن يتم نقلها بأسرع ما يمكن إلى بوق الرحم للنعاج المتوائمة لتحمل الأجنة إلى فترة
لمخاض الطبيعي وتتم مراقبة حملها بواسطة جهاز تخطيط الصدى Ultrasonography
وتعد النعاج إيجابية النتيجة في اليوم 35 من الزرع تعتبر نعاجاً حوامل.

أما العامل الآخر الذي يجب توفره لتحقيق عملية نقل نووي ناجحة:

العامل الثاني: يتمثل بالطور للنواة الواهة، فالأنوية الواهة التي تكون في الطور
G1 أو GO من دورة الخلية (الشكل 6 - 6) تعطي نتائج أفضل من تلك التي تتواجد في
الطور المتأخر S أو G₂.



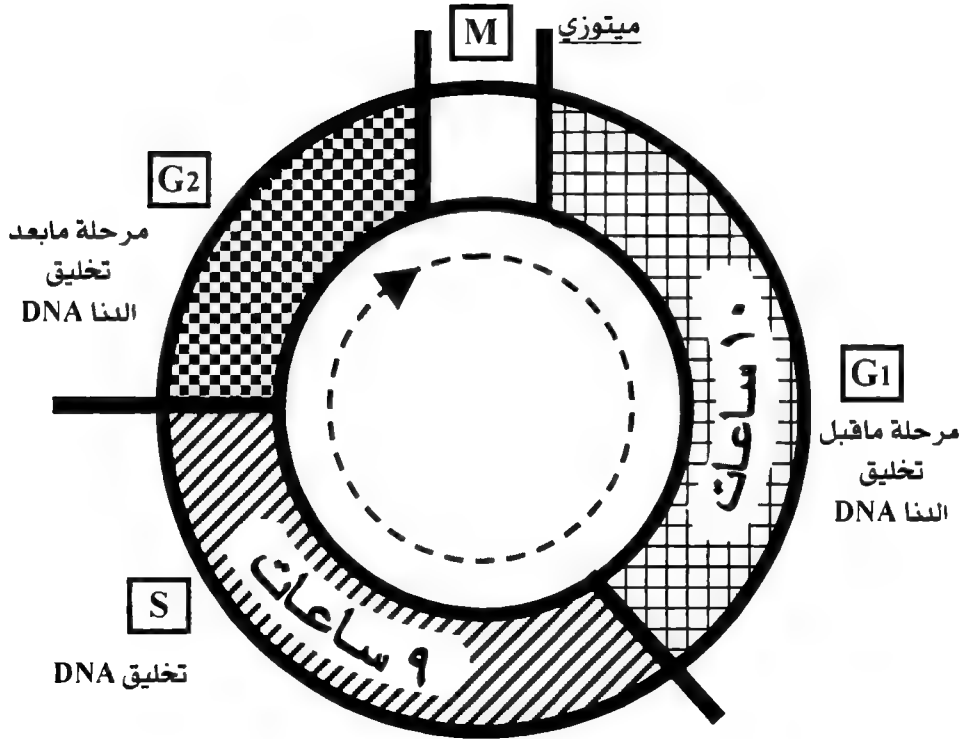
الشكل (6 - 6): يوضح مخطط لدورة نمو وانقسام النواة لخلية حقيقية النواة (نموذجية)

يختلف الزمن الكلي المطلوب لإتمام دورة ما إلى حد كبير من خلية إلى أخرى وباختلاف الظروف البيئية، ففي أجنة بعض الحيوانات هناك دورة خلية كاملة كل 30 دقيقة وفي اللبائن البالغة تستغرق دورة الخلية عادة حوالي 24 ساعة ولا تقل عن ست ساعات إطلاقاً. إن أكثر الفترات تبايناً من خلية إلى أخرى هي طور الـ G1 (حين تنمو الخلية ولكن دون بناء الدنا) والـ G2 (حين تنمو الخلية وتنتهي لبدء الانقسام) وفي الخلايا سريعة الانقسام قد لا تكون هاتان الفترتان موجودتين تقريباً. أما في الخلايا بطيئة الانقسام فإنها قد تصل ساعات أو حتى أياماً.

6 - 2 - 5 - 2 دورة الخلية :

يحتاج النمو إلى زيادة في كتلة الخلايا، وتضاعف المادة الوراثية، والانقسام يضمن أن كل خلية بنوية يصل لها مجموعة متساوية من المادة الوراثية ليؤكد المحافظة على خط الخلية. وهذه الخطوات تحدث في نظام مرتب خلال دورة حياة الخلية (الشكل 6 - 7)، وفي البداية فإن الخلية الثنائية المجموعة الكروموسومية ($2n$) تمر بفترة من النمو وزيادة في الكتلة. وهذه الفترة تعرف بـ G1.

وفي الخلايا التي تتطلب دورة حياتها الكاملة 24 ساعة، فإن المرحلة G1 تحتاج إلى العشر ساعات الأولى. وهذه الفترة تكون مخصصة لنمو الخلية والتجهيز الكيماوي لبناء الحامض النووي الدنا DNA. وعند وقت معين يبدأ تضاعف المادة الوراثية. وخلال هذا الطو البنائي (S) الذي يستمر 9 ساعات، يتم تخليق الدنا ومضاعفة كل الكروموسومات. هذه التراكيب المتضاعفة تعرف باسم أزواج الكروماتيدات الشقيقة وتحتوي كل منها على نسختين متطابقتين من الكروموسوم بعد اكتمال التضاعف الكروموسومي. وتدخل الخلية في مرحلة النمو الثانية والتي تسمى G_2 . وهذه المرحلة التي تلي بناء DNA تحتاج أربع ساعات وتستمر حتى بداية الانقسام الميتوزي (M) والذي يحتاج إلى ساعة واحدة. وخلال الانقسام الميتوزي تنفصل أزواج الكروماتيدات الشقيقة، وتذهب كل واحدة إلى خلية من الخليتين البنويتين.

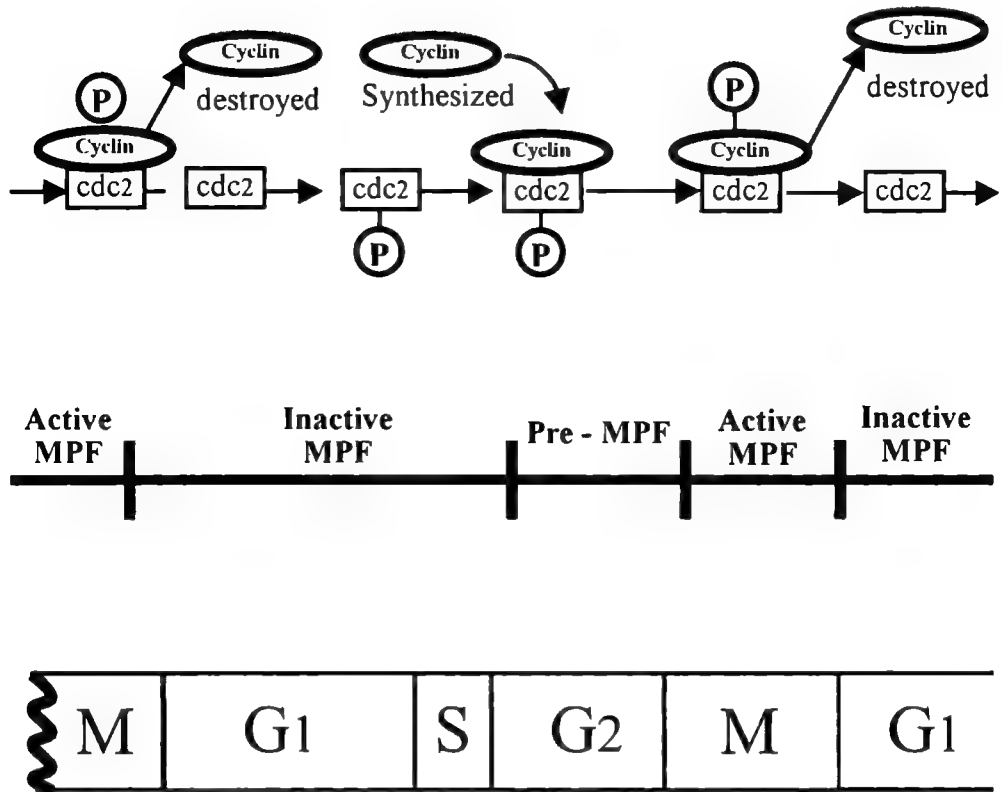


الشكل (6 - 7): رسم تخطيطي يوضح مراحل دورة خلية نموذجية من خلايا الثدييات بعد تنميتها في مزرعة أنسجة لفترة جيل مدتها (24) ساعة.

إن السمة الرئيسية لفترة التشطر (Cleavage Period) هو الموجات المتعاقبة من الانقسام الفتيلي (الخيطي) (Mitosis) التي تجري في الجنين وكل انقسام فتيلي (غير مباشر) يكون تحت السيطرة الكاملة لبروتينات والتي تحافظ على تركيب ووظائف الخلايا لبليون من السنوات أو أكثر ومثل هذا التفسير يستند إلى وجود هذه البروتينات في الكائنات الحية المختلفة. والدراسات الأولى على بيوض الضفادع اقترحت وجود العامل المحفز للنضوج Maturation - Promoting Factor (MPF) والذي يحفز الانتصاف (الانقسام الاختزالي) Meiosis في خلية البضة المبكرة. إن الـ MPF يعمل على تنظيم الانقسام الفتيلي والانتصاف (الانقسام الاختزالي) Mitosis and Meiosis. وأظهرت دراسات أخرى أن الـ MPF الفعال هو عبارة عن معقد مكون من بروتينين، يدعى الأول (cdc 2) أو (دورة انقسام الخلية) (cell division cycle)، والثاني يدعى cyclin والذي يقود الخلية خلال دورتها التفتلية (الخيطة أو المايوتوزية).

إن الدورة التفتلية في أي خلية تنقسم إلى مراحل أو أطوار وبالأساس هناك حالتان للخلية . حالة كونها في عملية الانشطار الخيطي وحالة كونها ليست في هذه العملية والأخيرة تسمى الطور البيني (Interphase) وهي المرحلة بين نهاية انقسام وبداية الانقسام التالي . ولقد كان ينظر إلى الطور البيني في السابق بأنه مرحلة راحة أو استقرار (Resting Stage) ولكن في الوقت الحاضر يعتبر مرحلة نشاط خلوي فعال ومكثف وخاصة على مستوى الفعاليات الأيضية والطور البيني (غالباً ما يدعى بالطور G1) أو فترة النمو الأولى وهي الفترة التي تمارس الخلية فيها فعاليتها الاعتيادية في تكون الحامض النووي الريبوزي (RNA) وتكوين البروتين ثم تدخل الخلية في طور التركيب - S Phase ويشهد هذا الطور تكوين جزيئات جديدة للـ DNA أي أن الدنا الأصلي يتضاعف . ويعقب تخليق وتضاعف الدنا الطور G2 أو فترة النمو الثانية (gap2) وهي فترة نمو تعقب تضاعف الدنا وتنسيق البدء في عملية الانقسام أو الانشطار الخيطي (الفيلي) الفعلي (الطور M - Phase (M - وتنطبق المراحل المذكورة للطور البيني على الخلايا التي هي في حالة انقسام مستمر أي أنه لا تلبث أن تتم عملية انشطار حتى تبدأ بالتحضير لانشطار تال . ولكن هناك أنواع من الخلايا (في الكائن البالغ) تبقى لفترات طويلة (أسابيع أو أشهر أو حتى سنين طويلة) متحدة فلا تنقسم أو قد تنقسم في فترات متباعدة ففي مثل هذه الحالة تبقى الخلية في الطور البيني ولا تعد نفسها للانشطار أي أنها لا تمر في كل الأدوار المذكورة وقد أطلق البعض على هذه الفترة بـ (GO). يتواجد البروتين cdc2 خلال كامل دورة الانقسام التفتلي (الانشطار الخيطي) أما البروتين الآخر السايكلين (Cyclin) فيتم تخليقه وتراكمه خلال الطور البيني ويرتبط الأخير مع البروتين cdc2 ليكون مركب (Pre - MPF) أو معقد العامل المحفز السابق للنضوج (Prematura tion - Promoting Factor) قبل دخول الخلية للطور M أو بدء الانشطار الخيطي . إن التحوير الأنزيمي يحول هذا المعقد إلى الشكل الفعال من الـ MPF (الشكل 6 - 8) الذي يعمل على بدء عملية الانشطار الخيطي من خلال الفعالية النوعية للـ MPF يبدأ تحليل وتحطم الغلاف النووي وتحفيز تجمع خيوط المغزل ويتضمن العديد من فعاليات الـ MPF فسفرة البروتينات فتحلل الغلاف النووي على سبيل المثال يعود إلى فسفرة الصفائح النووية (Nuclear lamins) أو بروتينات الغلاف فالفسفرة تسبب تفكك أو انفصال الصفائح مما يؤدي إلى تفسخ (disintegration) الغلاف النووي والـ MPF الفعال يعمل أيضاً على تنشيط الأنزيمات المسؤولة عن التكسر أو التحلل المفاجيء للسايكلين cyclin . وعندما تقل مستويات السايكلين عن عتبة معينة (Certain threshold) فإن بروتين الـ

$cdc2$ في معقد الـ MPF يفقد فعاليته وبالتالي تنتهي دورة الانشطار الخيطي وإن فقدان فعالية الـ MPF يتيح للأنزيمات الفوسفاتيز الخلوية من إزالة مجاميع الفوسفات والتي تمت إضافتها إلى البروتين تحت تأثير الـ MPF. وأحد التأثيرات لذلك سيكون إعادة تكوين الغشاء النووي عندما تبدأ عملية نزع مجاميع الفوسفات من الصفائح النووية وأنزيمات الفوسفاتيز سوف تثبط الأنزيمات التي تكسر السايكلين متيحة بذلك إعادة تجميع وتراكم السايكلين في الخلية خلال الطور البيني وهذا ينظم المراحل من أجل إعادة تكرار الدورة التفتلية (الانشطار الخيطي).



الشكل (6 - 8) : يبين دورة الخلية وعوامل السيطرة عليها.

MPF = Maturation - Promoting Factor

الفصل السابع

الطريق نحو دولي

7 الطريق نحو دوللي The Road To Dolly

7 - 1 استنسال دوللي خطوة للبداية أم بداية للنهاية

تم كل شيء بهدوء وروية وسكون في مختبر متواضع يقع بين المرتفعات الجبلية التي يلفها ضباب تلك المناطق الباردة من جبال اسكتلندا الموشحة باللون الأخضر الزاهي جنوب مدينة أدنبرة، حيث يقع معهد روزالين Roslin Institute وهناك كان الحلم الذي أصبح حقيقة في يوم 12 تموز 1996 حين تم إنجاب النعجة الصغيرة دوللي في مثل هذا اليوم ولكي تصبح فيما بعد أشهر نعجة في التاريخ. إذ ملئت صورها الصحف والمجلات وكتب عنها أكثر مما كتب عن أوبنهايمر ونظريته الذرية، وانتظر العلماء بشغف مواليدها، النعجة التي أصبحت بين عشية وضحاها أسطورة والتي أطلق اسمها «دوللي» على اسم مطربة الريف دوللي بارتون (الشكل 7 - A , B).



(B)



الشكل (7-1 A): النعجة الأشهر في التاريخ «دوللي» أول كائن حي يتم استنساله من خلية جسدية.

الشكل (7-1 B): المغنية الريفية البريطانية (دوللي بارتون لأنها الأجمل أطلق مبدعو الاستنسال اسمها على النعجة المستنسل).

كان الاستئصال حلاً رادوا كل من كيث كامبل (Keith Kampbell) وآيان ويلموت (Ian Wilmut) (الشكل 7 - 2) في الحصول على قطعان من ملايين الخراف والنعاج تملأ الآفاق وتغطي قرص الشمس. وحقق الفريق البحثي الذي ترأسه (ويلموت) نجاحاً منقطع النظير في استئصال النعجة «دوللي» من خلية جسمية ناضجة ومتخصصة، وبخلاف كل الآراء العلمية السائدة. وكان «ويلموت» باحثاً فذاً، حصل على شهادة الدكتوراه من جامعة كامبردج العريقة وكان بحثه يتعلق بطرائق تجميد مني الخنازير، وأجرى بحوث ما بعد الدكتوراه في جامعة كامبردج على تقنيات تجميد الأجنة الحيوانية، التحق بعدها ويلموت بمعهد روزالين في اسكتلندا والممولة بحوثه من قبل شركة PPL للعلاجات، وعمل في مجال دراسة طرائق تحسين إنتاج الحيوانات المهمة اقتصادياً وعلى حيوانات المزرعة المهندسة وراثياً لإنتاج البروتينات العلاجية.



الشكل (7 - 2): العالم آيان ويلموت أول استئصال لكائن حي من خلية متخصصة.

بدأت طلائع النجاح تتوالى منذ عام 1994 إذ تم حل العديد من العضلات المتعلقة بكيفية جعل الخلايا هامة أو هاجعة quiescent. وقبل الاسترسال في هذا المنحى المعرفي يجب أن نذكر بعض الحقائق الجوهرية هي:

1 - إن الإعلان عن استئصال «دولي» كان في الحقيقة الإعلان ولأول مرة عن إنتاج كائن حي يتم استئصاله من خلية حية متميزة ومتخصصة (كان الاستئصال حتى قبل وقت قصير من «دولي» يتم بالانشطاز الجنيني ومن خلايا منتزعة من أجنة في المراحل المبكرة من النمو الجنيني).

2 - إن نجاح عملية الاستئصال بحد ذاتها كانت إشارة عميقة الدلالة إلى إمكانية استخدام التقنية ذاتها في استئصال البشر.

3 - تحتوي الخلايا المتميزة والمتخصصة على كامل الذخيرة الوراثية اللازمة لتكوين الكائن الحي الكامل ولكن طبيعة التنظيم الجيني الدقيق والخاضعة لآلية فتح وإغلاق Switch off - on غاية في الدقة تعمل على كبت فعالية جميع الجينات غير ذات العلاقة بوظيفة الخلية وتبقي فقط على الجينات ذات العلاقة المباشرة بوظيفة الخلية في حالة من الفعالية والنشاط الدائم طيلة فترة حياة الخلية، إذ تمتلك نواة كل خلية من خلايا الجسم دليل تعليمات (معلومات) يحدد وظيفة الخلية. وعلى الرغم من أن كل خلية تمتلك الدليل نفسه فإن الأنماط الخلوية المختلفة سوف تستعمل مقاطع مختلفة من هذا الدليل في برمجة وظائفها. ويتمثل الإعجاز الرباني في احتواء هذا الدليل على معلومات تسمح للجنين ذي الخلية الواحدة (البیضة المخصبة) بأن يصبح جنيناً، ومن ثم طفلاً وليداً. ومع أن الطفل يتنامى في نضجه الجسدي والعقلي، فإنه يستمر في استعمال المعلومات الموجودة في دليل التعليمات. وعلى الرغم من أن كلاً منا متفرد في كينونته، فإن دليل التعليمات غالباً ما يظهر تبايناً ضئيلاً، محدداً معظم السمات الجسدية وكثرة من الخصائص السلوكية التي تميز الواحد منا عن الآخر كأفراد. إن هذا الدليل الاستثنائي (الذي يعرف عادة بالمورث Genome) مكتوب بأربعة أحرف تمثل كامل أبجديته، وتتمثل بنيوكليوتيدات: الادينين (A)، والثايمين (T). وإن التسلسل الدقيق للنيوكليوتيدات في الدنا (DNA) هو الذي يعين المعلومات مثلما يعين تسلسل الحروف ويحدد ماهية ومعنى الكلمة. ويتم في كل انقسام خلوي تضاعف الدليل بكامله بحيث تحتوي كل من الخليتين الابنتين نسخة كاملة من دليل الخلية الأم. ويتألف هذا الدليل في كل من الإنسان والفأر من ثلاثة

بلايين زوج نيوكليوتيدي فإذا ما تمت كتابة الأحرف (الممثلة للنيوكليوتيدات) في تعاقب معين بحيث تحوي الصفحة الواحدة ثلاثة آلاف حرف، فإن الدليل سيتألف حينئذ من ألف مجلد، وسيشمل المجلد الواحد على ألف صفحة وتتناغم مفردات هذا الدليل وتتكامل في تناسق مدهش لكي تكون البيضة المخصبة إنساناً أو فأراً أو نعجة، والعجيب أن 99 % من صفات الإنسان تتماثل مع جينات الفأر، وتؤدي الغايات نفسها.

4 - إن مفتاح عملية الاستئصال يكمن في جعل الخلايا هامة وهاجعة وفي هذه الحالة ستمتلك جميع جيناتها ذات الاحتمالية في التعبير عند تنشيطها من جديد.

تتميز الخلايا الهاجعة بفقدان تعبيرها الجيني، أي لعدم إنتاجها للـ mRNA - mRNA لجزيئات الموجهة لإنتاج البروتين، وتتميز هذه الخلايا بسهولة التعامل معها وإمكانية الاحتفاظ بها لعدة أيام بحالة متمثلة وملائمة، إضافة إلى الاعتقاد السائد بملائمة كروموسومات الخلايا الهاجعة وحالتها الفيزيائية المناسبة للخضوع لإعادة البرمجة.

5 - تتم إعادة البرمجة الجينية للخلية الهاجعة بدرجة عالية من التعقيد البالغ ويعود ذلك إلى التعقيدات المصاحبة للتعبير الجيني خلال المراحل المبكرة من التطور الجنيني (في حالة الأجنة) تتم عملية السيطرة بوساطة بروتينات متخصصة وأنواع من الرنا المرسال التي تصنع في الخلايا الطليعية للبيضة، بعد مرور ثلاثة أيام تقريباً يبدأ الجنين عندها في إنتاج الرنا المرسال الخاص به (راجع الفقرة 5 - 1) وقد تعود نسبة الولادات الحية المنخفضة إلى التعقيدات الهائلة المصاحبة لتنظيم التعبير الجيني، إذ يشكل عدم انبعاث أحد الجينات الهامة في الوقت المناسب وفي مرحلة حرجية من النمو المبكر للخلايا إلى تأثير قاتل للأجنة.

6 - على الرغم من أن الإشارات قد دلت على أن نواة الخلية المانحة كانت تعود لخلية ضرع ثدي كاملة التمايز فإن «ويلموت» ذاته قد أشار فيما بعد وبالتحديد في عام 1999 إلى استحالة التأكد من ذلك نظراً لاحتواء مستنبت خلايا الضرع المستخدمة في التجربة على خلايا أقل تمايزاً وتخصصاً تتواجد بأعداد قليلة في الضرع وهذا

يعني إلقاء بعض الشكوك حول إمكانية إعادة برمجة الخلايا كاملة التمايز والتخصص ويتطلب إجراء التجربة على خلايا متخصصة أخرى .

7 - الحصول على نسبة واطئة للغاية من النسل القابل للبقاء (العيوش) لا تتجاوز 1 - 2% تم تسجيلها في عدد كبير من المختبرات .

8 - ضرورة استخدام سلالتين من نوع مختلف أحدهما تقدم الخلية المانحة للنواة وأخرى تقدم خلية البيضة وتكون الأم البديلة الحاملة للجنين المستنسل .

9 - يعتمد نجاح عملية الاستنسال على حصول التوافق بين الخليتين المانحة (للنواة) والمتلقية لها. مما يعني ضرورة ضرورة تنسيق دورات تضاعف الدنا وإنتاج الرنا المرسال، وهنا يبرز دور الخلايا الهاجعة والساكنة التي لا تضاعف الدنا الخاص بها أثناء عملية النقل .

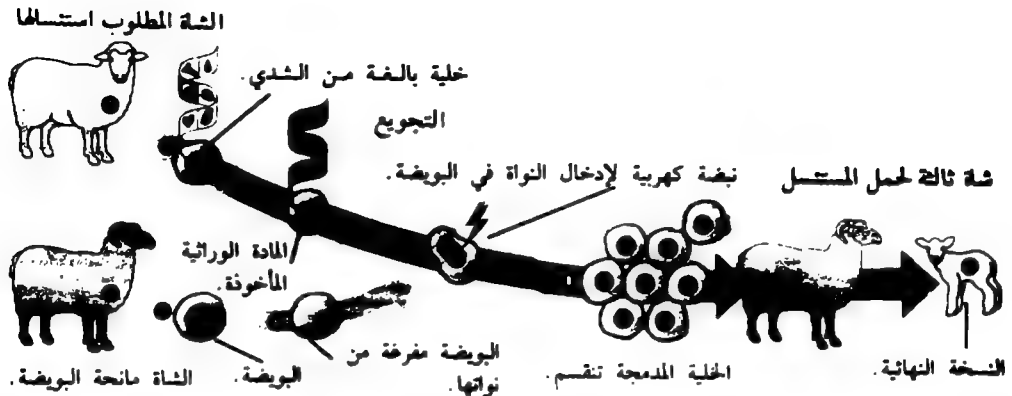
7 - 2 الأسلوب المستخدم في استنسال «دولي»:

بعد نجاح تقنيات النقل النووي المستخدمة في استنسال الحيوانات الاقتصادية من خلايا جنينية والإنجاز الذي حققه الباحث «ويلموت» في استنسال الحملين «ميكان» و «موراك» في صيف عام 1995 من خلايا مستزرعة مشتقة من جنين عمره تسعة أيام فقط اتجهت جهوده نحو الاستنسال من خلايا مستزرعة أكثر تمايزاً، حيث اختبر إمكانية خلايا الأرومة الليفية الجنينية (الفايبروبلاست) على المساهمة كخلايا مانحة للنواة في تقنية الاستنسال وكذلك الخلايا المأخوذة من ضرع نعجة حامل في الأشهر الثلاثة الأولى من حملها .

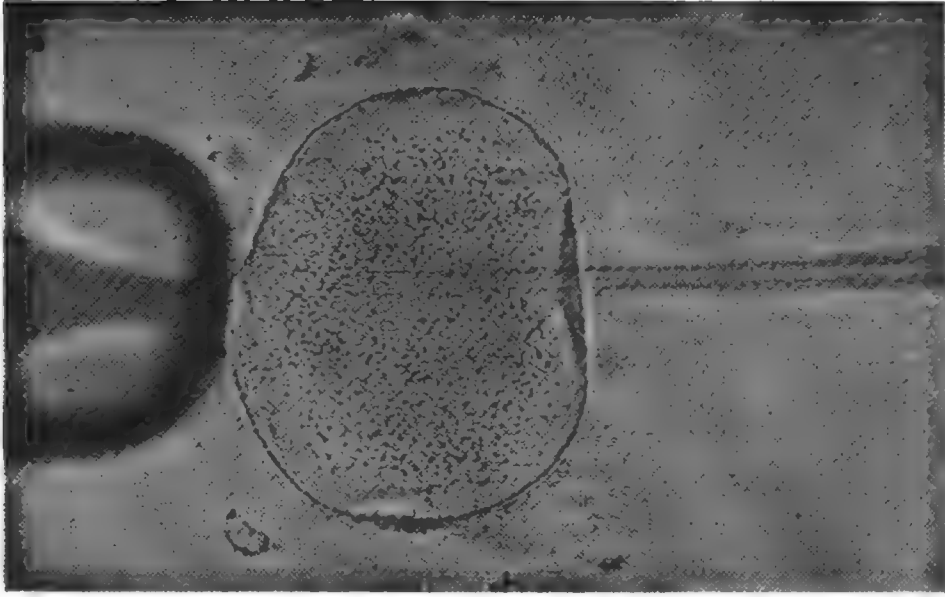
وهذا ما تم في استنسال النعجة «دولي» (الشكل 7 - 3)، إذ استخدم «ويلموت» خلية جسمية من ضرع نعجة حامل ملساء الوجه Finn Dorset Ewe وكان اختياره موفقاً، حيث تكون خلايا الضرع في فترة الحمل في قمة الفعالية والنشاط . تحتوي خلية الضرع بطبيعة الحال على كل الجينات اللازمة لتخليق وإنتاج نعجة كاملة مطابقة وراثياً للأصل الذي اشتقت منه الخلية، ولكن الجينات ذات العلاقة بوظيفة هذا الخلية هي التي تكون فعالة وظيفياً، ولغرض تسكين جميع جينات الخلية وجعل الخلية هامة وهاجعة يتم

تجويع الخلية من خلال تنمية الخلايا على أوساط غذائية فقيرة في محتواها من مصل جنين البقر وعموماً فإن الأوساط تحتوي بحدود 20/1 مما تحتاجه الخلية من المواد المغذية، حيث تنمي الخلايا على هذه الأوساط لمدة 5 أيام مستمرة، حتى تدخل الخلايا في طور Go وتصبح هامدة، يتم إيقاف عمل كل جينات الخلية (Switch off)، أخذ الباحث بعدها بيضة غير مخصبة من نعجة اسكتلندية سوداء الوجه Black face Ewe، حيث أخضعت للتطويع المجهري باستخدام ماصة دقيقة بسمك الشعرة لغرض وخز أو ثقب خلية البيضة وإزالة نواتها (الشكل 7 - 4).

أعقب ذلك القيام بدمج خلية الضرع الجسمية و خلية البيضة منزوعة النواة بالاندماج الكهربائي Electric Fusion باستخدام نبضات كهربائية خفيفة (راجع الفصل السادس)، حيث اندمجت الخليتين كاندماج فقاعتي الصابون وباستخدام نبضة كهربائية ثانية استهدفت محاكاة النواة المانحة المدمجة في خلية البيضة المتلقية لانفجار الطاقة في عملية الإخصاب الطبيعي وتنمية الخلايا في وسط زرع متكاملاً ويحوي على كافة المواد المغذية فإن جميع جينات الخلية سيتم إيقافها من سباتها ويتم تنشيطها وتحول بذلك خلية الضرع إلى شبه خلية جنينية حيث تبدأ بالانقسام والتكاثر.



الشكل (7 - 3): التقنية التي استخدمها «آيان ويلموت» في استئصال «دوللي» في معهد روزالين في أدنبرة/ اسكتلندا



الشكل (7 - 4): تستخدم ماصة دقيقة في إزالة وسحب النواة من البيضة بعد تثبيتها بالماصة الداعمة (إلى اليسار).

وفي الحقيقة فإن الدفعة الأولى من النبضات الكهربائية تعمل على حث خلية البيضة منزوعة النواة على تقبل ودمج خلية الضرع الجسمية والدنا الذي تحويه في نواتها، أما الدفعة الثانية من النبضات الكهربائية فإنها تعمل على تنبيه Triggered أو تفجير الفعاليات الكيميائية الحياتية للخلية ومراحل انقسام الخلية من خلال تحفيزها للعامل المسؤول عن الانقسام Division Promoting Factor (DPF). واستغرقت عملية نمو الخلية المدمجة في الوسط الزرعوي ذو المحتوى الغذائي الكامل لمدة أسبوع، حيث تم بعد ذلك ازدياد الجنين المتنامي في رحم نعجة اسكتلندية ثالثة (سوداء الوجه)، وبعد فترة حمل كاملة ولدت النعجة الصغيرة «دوللي» في 5 تموز 1996 وهي نسخة طبق الأصل للنعجة الأولى (ملساء الوجه) التي أخذت منها خلية الضرع الجسمية. ورغم هذا الإنجاز الكبير الذي نال صدى إعلامي كبير وواسع النطاق فإن الصورة النهائية للإنجاز لم تكن بدون شوائب ومنها ما تم ذكره آنفاً بخصوص خلية الضرع المأخوذة كنواة مانحة وصعوبة التأكد من درجة تمايزها في مستنبت الخلايا المأخوذة من الضرع، أما النقطة المهمة الأخرى

فهي نسبة النجاح الواطئة، حيث أجرى الباحث «ويلموت» وفريقه البحثي 277 محاولة (نواة مانحة أدمجت في بيضة مفرغة من النواة) ونجحوا في الحصول على 29 جنيناً فقط نجحت بالبقاء لمدة تزيد عن 6 أيام ولم يبقَ فيما بعد من الرقم الأخير سوى «دولي» التي أكملت فترة الحمل بنجاح، وتم في تجارب أخرى أجريت في نفس المعهد الحصول على 9 حملان أخرى.

ومن المهم ملاحظة أن الأسلوب المستخدم من قبل «ويلموت» على الرغم من الدوي الإعلامي وكونه نصراً علمياً مؤكداً فإنه غير عملي بالنسبة للمنظور الاقتصادي مقارنة بأسلوب الاستئصال أو الانشطار الجنيني، إذ تبرز العديد من المشاكل التقنية المصاحبة لأسلوب الخلايا الهاجعة والتحكم في الانبعاث الجنيني إضافة إلى مشكلة خطيرة تتمثل بكون حجم الكائنات الحية المستنسلة الوليدة يكون أكبر بكثير من حجم مثيلاتها الطبيعية ويقول «ويلموت» بأن كل المحاولات التي بذلت لحل هذه المشكلة قد باءت بالفشل، حيث يمكن للزيادة الحجمية أن تعرض الأم وليدها للخطر (بلغ وزن الحملان المستنسلة بحدود تسعة كيلوغرامات مقارنة بمعدل وزن الحمل الطبيعي عند الولادة والبالغ بحدود 4.75 كيلوغرام).

وفي الحقيقة فإن التقنية المستخدمة في الاستئصال يمكن أن تثير العديد من التساؤلات والتي تتعلق باستخدام الاندماج الكهربائي في دمج خلية الضرع المانحة للنواة في البيضة منزوعة النواة وعدم استخدام التطويع المجهرى وتقنية الجراحة المجهرية في إيلاج الخلية المانحة للنواة والدرجة التي يمكن أن يسهم فيها سايتوبلازم خلية البيضة في توجيه نواة خلية الضرع نحو التحول إلى خلية تحاكي الخلية الجنينية من حيث قدرتها على التكاثر والانقسام.

وتساؤل آخر يمكن أن يثار وهو ماذا يمكن أن يحدث لو تم زرع نواة الخلية دون الخلية ذاتها في البيضة منزوعة النواة؟ هل ستبدأ خلية البيضة الحاوية على نواة كاملة العدد الكروموسومي بالانقسام كخلية جنينية حين يتم تحفيزها كهربائياً؟ أم أن سايتوبلازم الخلية المانحة للنواة ضروري لتحويل النواة المانحة إلى خلية جنينية متنامية؟ هذا ما يتعلق

بالتساؤلات أما ما يتعلق بالأسرار التقنية وهي عديدة ويتمثل أهمها بالطريقة المستخدمة في تجويع الخلايا لتحويلها إلى خلايا هادمة (ساکنة)، حيث يتم تحفيز وحث حالة الهمود بزراعة الخلايا في طبقة مغذية من وسط GIBCO أو وسط TC 199 الحاوي على تركيز واطئ من المصل (FCS % 0.5 بدلاً من 10 % FCS) ولمدة 5 أيام.

أما بالنسبة إلى تنشيط الخلية الواهة للنواة المندمجة في البيضة منزوعة النواة، فإن العملية تتم في وسط تنشيط خاص هو وسط M2 الحاوي على 10 % من FCS و 5 مايكرومول من النوكودازول (في حالة التنشيط المتأخر) يتم بعدها استخدام النبضات الكهربائية المثبتة للتنشيط.

ويقول آيان ويلموت» بأنه على الرغم من قيام باحثين آخرين باتباع تقنيات مشابهة للاستئصال ولكنهم فشلوا بسبب عدم قدرتهم على تمييز العامل المفتاح لنجاح العملية وهو أن الخلية الواهة (Donor Cell) يجب أولاً أن تعامل ببعض المواد الكيميائية التي تعمل على إعادة تنظيم (reset) الساعة البيولوجية للخلية (Biological clock) بالطريقة التي تجعل الدنا الخاص بها يميل إلى التضاعف لتكوين دنا جديد أو ما يمكن أن يطلق عليه إعادة برمجة تعبير الجين (Reprogramming of Gene Expression).

ولكي نوضح الصورة التي يلفها الغموض، لا بد من التأكيد مرة أخرى على بعض الثوابت البيولوجية ومنها أن كل خلية تقريباً في الجسم تحتوي على الخريطة الوراثية للفرد وإن البويضات والمضغ المأخوذة من فصائل مختلفة تحتوي على نوى منظمة للجينات تقوم بتشغيل أو إيقاف الجينات عن العمل في مختلف مراحل الحياة.

فلو فرضنا أن البويضة لقحت بالحيمين وتم تخصيبها فإن الخلية المخصبة تبدأ بالانقسام إلى خليتين وهذه بدورها تنقسم إلى أربعة خلايا وفي انقسام ثالث تصبح ثمان خلايا (والسر هنا هو قبل الانقسام الرابع) فما هو السر الرهيب لعملية الخلق؟؟ إن هذه الخلايا الثمانية يمكن لكل منها أن تكون جنيناً حيث يمكن أخذ سبع خلايا وحفظها باستخدام التبريد بدرجة 160 تحت الصفر وبذلك يمكن حفظها لمدة 10 آلاف سنة وهذه

التقنية مستخدمة في العديد من المختبرات ومنها مراكز حفظ السلالات كالـ American Type Culture Collection (ATCC) في روكفيل/ واشنطن.

وتترك الخلية الثامنة لتتابع حياتها الرحمية فتتج كائناً كاملاً، والسر في الانقسام الرابع بالذات لأن الخلايا بعد هذا الانقسام تبدأ بالتخصص، أي أن الخلايا ولحد الانقسام الثالث (8 خلايا) تكون غير متخصصة وعند حدوث الانقسام الرابع أي في مرحلة (16 خلية) تبدأ في التخصص، فما هي الآلية التي يبدأ بها التخصص بحيث تكون كل مجموعة من الخلايا عضواً معيناً في الجسم، وما هي الإشارة التي تعطى لكل خلية بحيث توقف عمل جينات معينة وتقوم بتنشيط جينات أخرى تكون ملائمة لتخصصها اللاحق، وما هي الدقة العالية والإعجاز لكي يستمر الجنس البشري جيلاً بعد جيل علماً بأن مستوى التنظيم العالية مهم لأن أي خطأ يعني تكون 3 أو 4 قلوب أو أكباد مثلاً بدون ساقين أو يدين أو دماغ وهكذا.

وعلماء البايولوجيا يعرفون الآن أنه إذا أمكن التحكم بالنوى أو بالإشارة المنظمة للجينات فإنهم سيتمكنون من تجديد نمو الخلايا العصبية التي تعود للتوالد بصورة طبيعية بعد انقطاع أو تلف الحبل الشوكي، أو قد يكون بوسعهم أن يحددوا (Deprogram) إحدى الخلايا الجلدية ويوقفوا فقط الجينات ذات العلاقة بالوظيفة المطلوب تعويضها.

إن العواقب غير المرغوبة لتقنيات حديثة كالاستئصال ربما لا تزال غير مفهومة أو غير ظاهرة للعيان. إذ يذكر «ويلموت» في مؤتمر خصص لمناقشة الاستئصال عقد في شهر حزيران 1997 في فرجينيا/ الولايات المتحدة:

«إن برمجة الجينات في خلية الخراف الناضجة تعمل على تجديد شباب هذه الجينات ويمكنها الازدواج لاحقاً مع خلية بيضة مستلمة متزوع منها الدنا الخاص بها والجنين الناتج يمكنه النمو ليكون لاحقاً نسيلاً توأمية متطابقة للحيوان الناضج، ويستطرد قائلاً إن النعجة ذوللي مستمرة في النمو بصورة طبيعية وإنها يمكن أن تتكاثر بصورة طبيعية في الخريف»، وهذا ما تم فعلاً في 24 نيسان 1998، حيث أعلن عن ولادة الحمل بوني (Bonnie) (الشكل 7 - 5).



الشكل (7 - 5): أول ولادة ناجحة للنعجة «دوللي» كان الحمل (Bonnie) بوني ولد من تزاوج وحمل طبيعيين.

في حين بينت الدراسات اللاحقة أن برمجة الجينات في خلية الخراف الناضجة وعلى العكس مما أشار إليه «ويلموت» لن تعمل على تجديد شباب الجينات بل إن «دوللي» في الواقع عمرها من عمر الخلية الناضجة التي استنسلت منها وإنها تعاني من الشيخوخة المبكرة (راجع الفقرة 7 - 4 الاستنسال والشيخوخة المبكرة).

إن التطوير المستمر لتقنيات الاستنسال يمكن أن ينتج عنه إرساء أسس تقنية متقدمة فعالة وغير مكلفة اقتصادياً، إذ يشير عالم فلسفة التكاثر في جامعة موناخ في ملبون/ أستراليا (آلان تراونسون Alan Trounson) إن تقنية «ويلموت» في الاستنسال يتم اختيارها كخط جانبي فقط Side line وإن الهدف الأساسي للتجارب يتركز على إجراء التزاوج بين ذكور وإناث ماشية عالية النوعية ومنتجة واستخدام تقنية الاستنسال الجيني لمضاعفة عدد الأجنة الناتجة لعدة مئات من المرات وهي تقنية أكثر ضماناً وأقل تكلفة من مجرد استنسال خلية جسمية من حيوان ناضج ذو صفات محددة.

أما الباحث المتخصص بفلسفة التكاثر في جامعة وسكنسون في ماديسون/الولايات المتحدة فيشير إلى وجود فترة زمنية لا تقل عن عام كامل حتى في حالة تطبيق تقنية الاستئصال بنجاح وانسيابية نظراً للمدة الزمنية الطويلة نسبياً التي تتطلبها مدة حمل الأبقار (هذه المدة الزمنية تفصل بين ابتكار التقنية المستحدثة للاستئصال وبين الحصول على حيوان مستنسل على أرض الواقع .

7 - 3 الخلايا الجذعية والاستئصال العلاجي:

تشكل تقنية إنتاج الخلايا الجذعية والاستئصال العلاجي أحد أهم التطبيقات لتقنية الاستئصال، ويختلف الاستئصال العلاجي عن الاستئصال التكاثري بكونه لا يستهدف إنتاج نسيطة كاملة وإنما يستهدف إنتاج أجنة تنامي لكي تصل فقط إلى المرحلة الجنينية اللازمة لفصل وعزل خلاياه الجذعية، حيث يمكن استعمال الخلايا الجذعية المشتقة من الجنين في علاج أمراض مختلفة كالإيدز وداء باركنسون والحثل العضلي، إضافة إلى إمكانية الحصول على أنسجة بشرية يمكن استخدامها في غرس الأنسجة والأعضاء .

هذا وقد انهمك علماء بايولوجيا النمو والبايولوجيا التحولية في عزل واشتقاق الأنوية المتخصصة بتنظيم الجينات، ويمكن الحصول على الأنوية المنظمة من طريقتين أساسيتين: الأولى هو من الخلايا بالغة النمو والمخصصة والتي تتطلب تقنية بالغة التعقيد والصعوبة، أما الثاني فيتضمن اشتقاق الأنوية من الأطوار الجنينية المبكرة. وتمكنت شركة أونتوجيني Ontogeny Inc من استحصال براءات اختراع لـ 30 نواة تنشط الجينات المسؤولة عن مختلف الوظائف. ويعمل العلماء الآن على إنشاء خطوط دائمة وثابتة من الخلايا الجذعية الجنينية ذات القدرة على التمايز حسب الطلب والحاجة .

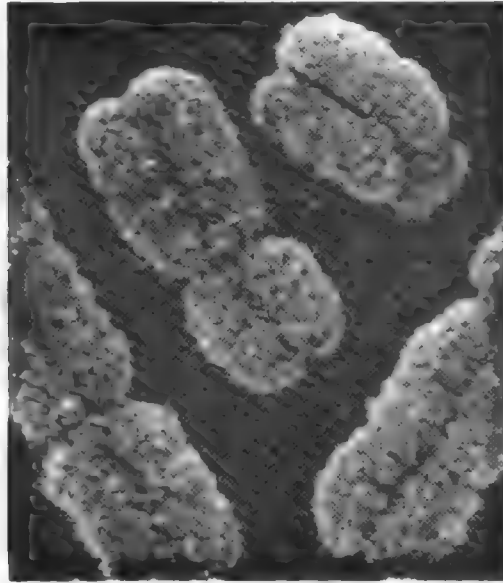
إن الحصول على خطوط من الخلايا الجذعية البشرية المكونة لنخاع العظم على سبيل المثال يتيح الفرصة للعلماء لاستنبات نخاع لزرعه لضحايا مرض السرطان، أو معالجة مرض فقر الدم المنجلي بتنشيط الجينات المسؤولة عن إنتاج الدم، وهذا ما تحقق فعلاً على يد الباحث «ستيوارت أوركين»، حيث تمكن هذا الباحث من إنتاج دم جديد من الخلايا الجذعية الفأرية، وهو إنجاز كبير، على الرغم من أن الدم الجديد كان غير فعال وظيفياً عند نقله إلى حيوانات أخرى .

يشكل إنتاج خلايا جذعية تتوافق مع مريض معين وذلك بإنتاج جنين باستخدام تقنية النقل النووي المعتمد على خلية مانحة من جسم المريض وبيضة إنسان كخلية متقبلة أحد الحلول الواعدة لمشكلة عدم التوافق النسيجي، حيث يمكن للخلايا المقترسة بهذه الطريقة وعلى الرغم من احتمال كونها غير متوافقة كل التوافق مع خلايا المريض فإن بالإمكان التحكم بالاستجابة المناعية الحاصلة بعد الغرس. ويشكل غرس أو زرع الأعضاء الغريبة Xenotransplantation أهمية خاصة في هذا المجال، حيث يواجه عدد كبير من المرضى من الذين يحتاجون إلى زرع الأعضاء خطر الموت قبل توفر المتبرعين المناسبين، ويواجه هؤلاء المرضى أحد المشاكل الرئيسية المتعلقة بزرع الأعضاء وهي الاستجابة الراضة فرط المزمة Hyperacute Rejection Response والتي تعمل على التدمير السريع للعضو المزروع بين الأنواع بسبب تواجد أجسام مضادة تتواجد طبيعياً في الدورة الدموية البشرية والتي يمكنها التمييز والتعرف المباشر على مستضدات الأعضاء الغريبة في الأنسجة المزروعة وهذه الأجسام المضادة تستهل أو تبدأ بإظهار استجابة يتوسطها العامل المتم Complement - mediated response والتي غالباً ما تكون سريعة وتسبب تحلل الأنسجة المزروعة. وتمكن العلماء فعلاً في عام 2000 من إنتاج خنازير تفتقد لتحريض المناعي وبالتالي يمكن استخدام أعضائها المختلفة في تجارب الغرس دون أن يولد ذلك استجابة مناعية خطيرة في جسم المتلقي.

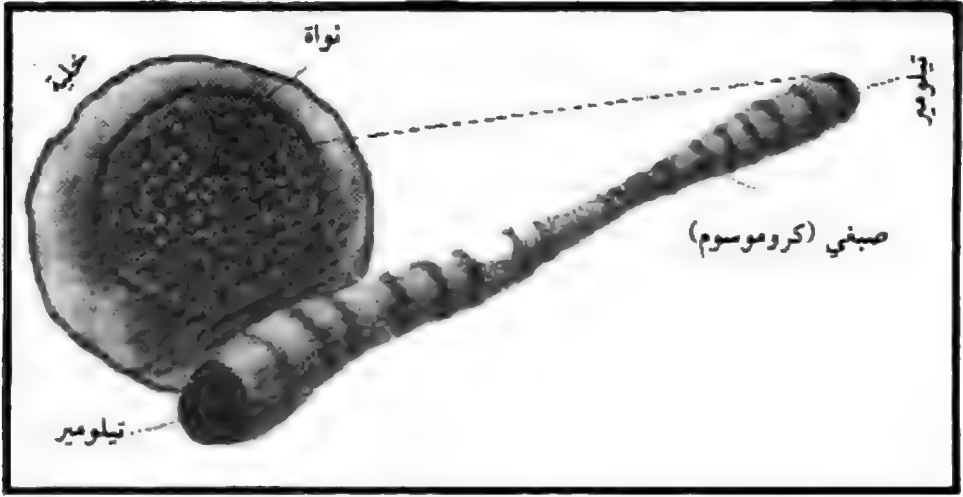
وتعمل العديد من الشركات المتقدمة وفي ظل تنافس شديد على تطوير تقنية الخلايا الجذعية، منها شركة «أونتوجيني» وشركة التقنيات المتقدمة للخلية، إضافة إلى شركة «جيرون» التي اندمجت مع شركة روزالين بايوميد. هذا وتثير مسألة استخدام الأجنة واستئصالها لأغراض علاجية المزيد من الاعتراضات الأخلاقية والقانونية، ففي بريطانيا على سبيل المثال يجيز قانون صادر في عام 1990 حول التخصيب البشري وعلم الأجنة يجيز إجراء البحوث حول الأجنة البشرية حتى يومها الرابع عشر على أساس أن الجنين في هذه المرحلة لا يمتلك على الإطلاق وسيلة الشعور بالألم أو الإحساس بما يحيط به ولكن القانون لا يتطرق بطبيعة الحال إلى الاستئصال العلاجي الذي ظهر في فترة لاحقة لصدوره.

7 - 4 الاستئصال والشيخوخة المبكرة:

كان لاكتشاف إصابة النعجة المستنسل «دوللي» بالشيخوخة المبكرة وقع الصدمة الهائلة على كافة مؤيدي تقنيات الاستئصال من الخلايا الجسمية وتطبيقاتها. فما الذي حدث فعلاً، وكيف توصل العلماء إلى هذه الحقيقة التي تهدد وبصورة بالغة الخطورة كل إنجازات تقنية الاستئصال والطموح والآمال التي عقدت عليها للهروب من حلقة «الفناء الذاتي» نحو رحاب الخلود التلقائي الدائم، حيث اكتشف العلماء أن كروموسومات النعجة «دوللي» متقاصرة وأقصر مما ينبغي أن تكون عليه في عمرها، وكانت هذه الحقيقة جزءاً من رسالة وجهها «آيان ويلموت» إلى مجلة الطبيعة (Nature) في شهر آيار 1999 يخبرهم فيها بأن العمر الحقيقي للنعجة «دوللي» هو تسع سنوات وليس ثلاث سنوات، إذ وجد أن الدنا التي تقع على طرفي الكروموسومات والتي لها علاقة في عملية التعمير (التقدم في السن) أقصر عند «دوللي» من أية نعجة أخرى في عمرها، وإن هذه الظاهرة كانت بدرجة أقل عند خروفين تم استئصالهما من خلايا جنينية، حيث تم التوصل إلى استنتاج محدد وهو أن المحتوى الوراثي للكائن المستنسخ يعكس في الحقيقة سن الكائن البالغ الذي استخدمت خلاياه لاستئصاله.



الشكل (7 - 6 - A): الكروموسومات البشرية مكبرة وتظهر التيلوميرات على أطرافها.



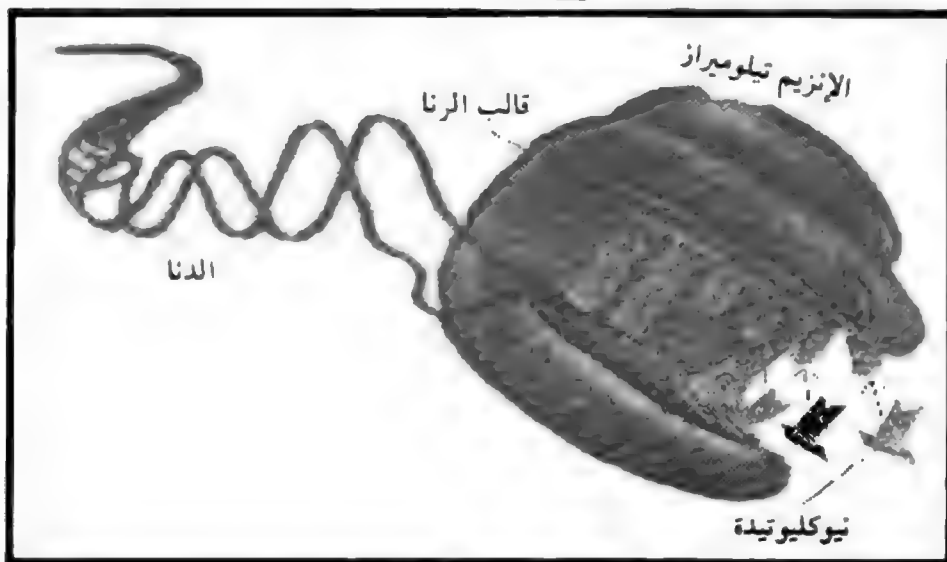
الشكل 7 - 6 - B): تحتوي الكروموسومات على قلنسوات (تيلوميرات) في أطرافها تعمل

هذه القلنسوات على استقرار وثبات الكروموسومات وتمنع التصاقها مع بعضها.

ولغرض التوسع بمزيد من التفصيل عن كيفية حدوث هذه الشخوذة المبكرة في الكائنات الحية المستنسلية ينبغي الإشارة إلى أن العلماء توصلوا إلى وجود عقد أو قلنسوات Caps تغطي طرفي الكروموسومات (الشكل 7 - 6) وتحافظ على ثبات واستقرار الكروموسومات وتمنعها من الالتصاق إحداها بالآخر خلال عملية التضاعف، وتسمى هذه العقد أو القلنسوات بالتيلوميرز Telomeres وتتكون هذه التيلوميرات من تتابعات خماسية القواعد تتكرر بكثرة، ولكل نوع حياتي متوسط يميز هذا النوع عن غيره من الأحياء، ففي الإنسان تتكرر بحدود 2000 مرة، وفي الحقيقة فإن فقدان منتظم لهذه التيلوميرات يحدث مع كل دورة تضاعف وانقسام خلوي وبعد 50 انقساماً تكون الخلية قد فقدت الجزء الأكبر من هذه العقد ومنها جينات طرفية الموقع وقد تكون مهمة لحياة الخلية.

وتمكن العلماء من معرفة آلية الخلود في الخلايا السرطانية والتي تنقسم إلى ما لانهاية وتبقى خالدة، حيث وجد العلماء أن التقاصر الحاصل في نهاية كروموسومات الخلية السرطانية وفقدان التيلوميرات يتم تعويضه بوجود فعالية عالية لأنزيم يعرف بأنزيم التيلوميراز Telomerase الذي يمتاز بصفة فريدة، حيث يمتلك قالباً من الرنا ويعمل على

بقاء وحدات تيلوميرية جزئية من المكررات التيلوميرية (الشكل 7 - 7). وبذلك يمكن أن يشكل إضافة هذا الأنزيم إلى مزرع الخلايا المستنبطة المانحة للنواة أو تحفيز آلية التعبير الجيني لإنتاجه في هذه الخلايا أحد الحلول الناجعة لإعادة عقارب الشيخوخة الخلوية إلى الوراء، حيث أعلن في نيسان 2000 عن نجاح العلماء في شركة التقنيات المتقدمة للخلية في وورثستر/ ماساشوستس - الولايات المتحدة عن استئصال ست بقرات بخلايا شابة وبافعة استئملت من خلايا مسنة.



الشكل (7 - 7): يمتاز أنزيم التيلوميراز بخاصية احتوائه على قالب خاص لتركيب الدنا التيلوميري (يتكون من جزيء مفرد من الرنا) يتكون من التعاقب AACCCC ، حيث يعمل الأنزيم على رصف أحد شريطي الدنا على هذا القالب وتبدأ إضافة النيوكليوتيدات المتممة والحصول على مكرر تيلوميري TTGGGG وعند اكتمال الوحدات الجزئية التيلوميرية آفغة الذكر يعمل الأنزيم على إنتاج ووصل وحدة تيلوميرية (مكررة) وذلك بالانزلاق إلى النهاية الجديدة للكروموسوم.

الفصل الثامن

الاستنسال البشري

النواحي الأخلاقية والدينية

والفلسفية

8 - الاستئصال البشري ... النواحي الأخلاقية والفلسفية والدينية

8 - 1 النواحي الأخلاقية والفلسفية

8 - 1 - 1 مقدمة تاريخية:

كان اكتشاف النار الشرارة الأولى في رحلة التقدم العلمي التي ما أن تسارعت خطاها بقوة حتى لم يعد بإمكان آية قوة إيقافها. فبين أطلال «موهنجودارو» أول حضارة في بلاد السند، وأبداع حضارات وادي الرافدين سومر وأكد وبابل، وجمال وتألق الحضارة الفرعونية على ضفاف وادي النيل، سجل الإنسان أروع الانجازات الحضارية في سلسلة متواصلة من مراحل التقدم العلمي المتسلسلة.

أما الثورة العلمية البيولوجية فتعود إلى عهد أكثر قرباً وتحديدأ عام 1543، حين تم وضع الجسد الإنساني تحت رحمة مشارط التشريح على يد «فيساليوس» وهو ما كان محرماً أشد التحريم قبل ذلك التاريخ. وفي آواخر القرن التاسع عشر والإطلالة الخجولة على القرن العشرين برز إلى الواجهة موضوع (تحسين النوع البشري)، حيث ترك «كارل بيرسون» في يوم من أيام شهر كانون الثاني سنة 1901 أعماله بمكتبة كلية الجامعة في لندن ليكتب إلى صديقه «فرانيس جالتون» عن موضوع له أهمية قومية بالغة (على حد تعبيره) والموضوع هو (التربية من السلالات الأصلح) وعن أهمية قضية الخصوبة في هذا البلد (انكلترا)، وكان «جالتون» نفسه من المتحمسين النشطين لليوجينيا (علم تحسين الإنسان)، وفي عام 1926 نشرت الجمعية الأمريكية كتاب (علم تحسين النسل... سؤال وجواب) أكدت فيه للقراء أن اليوجينيا ليست خطة لخلق سوبرمان أو لتربية البشر كما تربي الحيوانات ولكنه أكد أن اليوجينيا سوف تزيد من عدد العباقره وسترعى التزاوج

الأكثر انتقائية، لقد كانت نتيجة التفكير بموضوع تحسين مورثات الإنسان هو التطبيق العملي لما أسماه «فرانسيس جالتون» بتحسين النسل (Eugenics) وهو تصميم السلوك الاجتماعي لتحسين التركيب الوراثي للعشيرة في الإنسان، إذ حسب هذا المفهوم يجب أن ينتج أصحاب التراكيب الوراثية المتفوقة الجزء الأكبر من النسل، وينتج أصحاب التراكيب الوراثية المتخلفة الجزء الأصغر أو لا ينتجون جيلاً ثانياً على الإطلاق، ولكن الواقع الفعلي يتطلب الشجاعة والكثير من الحكمة لغرض التحديد بدقة من يجب ومن لا يجب أن ينجب أطفالاً، فمن الصعب تحديد كيف ومن يملك الحق في إصدار القرار، فالجزء الأكبر من الطراز الوراثي (Genotype) هو غير معروف والأسس التي يتم على ضوئها انتخاب أنسب الأنواع للبيئات والمجتمعات في الحاضر والمستقبل لم تستقر أو تتخذ طابعاً ثابتاً بعد، والإرادة ليست مطلقة التحكم في عملية التكاثر، وفي الحقيقة فإن أي تحرك إرادي لتحسين النسل في المجتمع يتطلب عشيرة سكانية واعية تهتم بعمق بنوعية مجملها الجيني.

إن المأساة الرهيبة قد وقعت فعلاً نتيجة تبني الحكومات لمثل هذه الآراء المتطرفة في أوروبا والولايات المتحدة التي بدأت منذ عقدي العشرينيات والثلاثينيات من القرن المنصرم بالتعقيم الإجباري لمواطنيها من ذوي القابليات العقلية المتخلفة، وما زالت قضية «العار التاريخي» تتفاعل في بعض الدول الأوروبية، كالسويد وسويسرا وفرنسا والنرويج وفنلندا، إذ اعترفت وزيرة الشؤون الاجتماعية في السويد، أن الدولة باشرت التعقيم القسري في الفترة الزمنية الممتدة من عام 1935 - 1976، وأن قرابة 60 ألفاً من النساء والرجال قد تم تعقيمهم قسراً، في سويسرا تم تعقيم الكثير من الأفراد وبموجب قانون صدر عام 1928 ويعتقد بأن السلطات قد استوحيت مبادئها في التعقيم القسري من نظريات عالم النفس السويسري «أوجست فوريل» حول علم الصحة العرقي، حيث شمل التعقيم القسري أفراد يتصفون بخصائص عرقية غير مرغوبة كالتخلف العقلي وضعف حاسة البصر، وفي فرنسا شملت الفضيحة تعقيم قرابة 15 ألف امرأة من نزيلات المستشفيات النفسية ويعانين من حالات تخلف عقلي بسيط يتمثل في عدم القدرة على

التحصيل الدراسي الجيد والاضطرابات العاطفية والاجتماعية وكانت اللجنة القومية الفرنسية للقيم والأخلاقيات قد حذرت في العام 1960 من إجراء التعقيم التعسفي .

وقد اقترح مولر Herman.J. Muller الحائز على جائزة نوبل بالطب ما أسماه خطة (الاختيار الجيني) وهي خطة تطالب الوالدين بالتخلي عن رغباتهما الأنانية في استمرار صفاتهما الوراثية والتحول عنها إلى إنجاب الأطفال بواسطة التلقيح الاصطناعي الذي يؤمن حسب رأيه تطوراً مثمراً للإنسان .

كما بين هيرمان مولر بوضوح منذ سنوات طويلة أن المهووبين الأكثر قدرة وتكيفاً مع المجتمع يجب أن يكونوا أسراً ضخمة، بينما أولئك الأقل قدرة وتكيفاً مع المجتمع يجب أن ينجبوا أقل من نصيبهم في النسل، وكان مولر يعتمد على التعلم وتنوير الرأي العام، والاختيار الإرادي لإيجاد الرغبة في تقوية الجبلية الجرثومية (المورثات) germ plasm للجيل التالي، ولتسهيل هذه الخطة اقترح التلقيح الصناعي Artificial Insemination للحالات التي تكون فيها المرأة طبيعية وسليمة صحياً وترغب في الأطفال وهي غير متزوجة أو متزوجة من رجل عقيم أو غير مؤهل وراثياً، وفي هذه الحالة سوف تستخدم بنوك الحيوانات المنوية Sperm banks والمجمد فيها الحيوانات المنوية بطريقة سليمة محمية من أي إشعاعات أو أخطار بيئية أخرى، ولو أن الحيوانات المنوية المحفوظة بهذه الطريقة لن تكون بالحالة الجيدة التي يمكن أن تكون عليها الحيوانات الطازجة، إذ يلزم من الحيوانات المنوية المحفوظة 14 حقنة في المتوسط لإحداث الحمل في المرأة، وأمكن إنتاج طفل باستخدام الحيوانات المنوية لرجل توفي بالفعل .

إجري التلقيح الصناعي بنجاح في الحيوانات في نهاية القرن الثامن عشر وأصبح في الثلاثينيات موضع اهتمام مربّي الحيوانات . ولقد بدأ استخدامه منذ منتصف القرن التاسع عشر بشكل متفرق على نساء يرغبن في الإنجاب برغم عقم أزواجهن، وثمة تقرير نشر في مارس 1934 بمجلة العلوم الأمريكية يقول أن عدد النساء اللاتي يطلبن السائل المنوي بالولايات المتحدة قد بلغ رقماً يتراوح ما بين ألف وثلاثة آلاف امرأة كل عام، وإن هؤلاء النساء عادة ما يطلبن السائل لأفضل الرجال بيولوجياً، وإن التلقيح الصناعي للأغراض اليجينية «سيمكن البشر من ميزة لم يكن يحظى بها إلا النباتات والحيوانات» .

ويقول مولر: إن دور النساء في التلقيح الصناعي لا يتعدى دور قوارير الحمل للحيوان المنوي للرجال العظام وحيث يقدر أن الرجل ينتج ما بين عمر 35 سنة و 55 سنة بحدود 340 بليون حيوان منوي مقابل إنتاج المرأة لعدد محدود من البويضات فإن رجلاً واحداً يستطيع أن يخصب في العام الواحد 5 ملايين امرأة». هذا الرأي المتطرف هو واحد من الأمثلة على ما يمكن أن يحل بالبشرية من دمار وخراب حينما يحاول الإنسان أن يغير نوااميس الطبيعة، وهنا نذكر القرآن الكريم وقوله تعالى: ﴿لله ملك السموات والأرض، يخلق ما يشاء، يهب لمن يشاء إناثاً، ويهب لمن يشاء الذكور، أو يزوجهم ذكراً وإناثاً، ويجعل من يشاء عقيماً، إنه عليم قدير﴾ (سورة الشورى/ الآية 45 - 50). وقال تعالى: ﴿الله يعلم ما تحمل كل أنثى وما تغيض الأرحام وما تزداد، وكل شيء عنده بمقدار﴾ (سورة الرعد/ آية 8).

وقطع علماء آخرون شوطاً كبيراً في تأسيس مصارف أو بنوك للأجنة المجمدة التي لا يزيد عمرها على يوم واحد، ويحفظ كل جنين في حاوية خاصة تحمل ملصقاً مدون فيه الصفات العامة للجنين، كالجنس واللون ولون العينين ومستوى الذكاء والذي يغرس في رحم امرأة مرضعة تحت الإشراف الطبي، ويمكن أن يكون لهذه الأجنة سوق رائجة إذا ما كانت ناتجة عن نطف وبويضات لنجوم السينما والرياضة أو العباقرة. وقد تم الإعلان عن بيع بويضات لأجمل النساء وعارضات الأزياء على صفحات شبكة الأنترنت (الشكل 8 - 1).



الشكل (8 - 1): بويضات ملكات الجمال وعارضات الأزياء عرضت للبيع في شبكة الأنترنت وبمبالغ تراوحت بين 25 ألف - 75 ألف دولار.

أطفال أنابيب الاختبار:

منذ ولادة الطفلة لوسي براون عام 1978 في إنكلترا فإن عهداً جديداً من صراع البشرية ضد العقم قد بدأ. ولدت الطفلة لوسي من جراء تخصيب بويضة والدتها في أنبوب اختبار ومن ثم زراعة البويضة المخصبة في رحم الأم. وتستمر التجارب لمعرفة مدى إمكانية حفظ البويضة قبل الإخصاب وإمكانية إنتاج التوائم في أنابيب الاختبار ولتوفير الظروف الملائمة لبقاء البويضة المخصبة في أنبوبة الاختبار لفترات طويلة قبل نقلها إل الرحم.

إن المضامين الاجتماعية والأخلاقية لمثل هذه التجارب أثارت الكثير من الجدل والخلاف، واعتبرت عملاً لا أخلاقياً ولا شرعياً واكتسبت النقطة المتعلقة بتحديد الوقت الذي تبدأ فيه حياة الإنسان أهمية كبيرة عند المهتمين بالمسائل الاجتماعية والأخلاقية، أي هل يعد الجنين في الأسبوع الأول والثاني من الحمل كائناً حياً أم مجرد كتلة لحمية لم تكتسب الروح والحياة.

والنقاط التي يمكن أن تثار تتضمن:

- 1 - إن الحياة مستمرة جيلاً بعد جيل وهي لا تنشأ بصورة جديدة أو غير مسبقة عند شخص ما وهي بالتالي لا تبدأ للمرة الأولى في الكون عند إخصاب بويضة ما.
- 2 - إن حياة الإنسان ليست فريدة من نوعها بمعنى أن وجود مليارات من البشر على سطح الكوكب يختلف عن وجود فرد واحد وحيد يعود لنوع من أنواع الحياة، وهنا علينا ملاحظة أن حياة الإنسان وإن كانت ليست متفردة ولكنها حقاً فريدة على مستوى المشاعر والأحاسيس والنشأة والتفكير والخبرة والمواهب والبيئة، وأنه لا يوجد شخصان على وجه الأرض تتوحد فيهما هذه العوامل.
- 3 - إن الإخصاب يؤدي إلى ترسيخ الشخصية الوراثية للجنين وذلك باتحاد الجينات العائدة للأبوين، فهل يعد هذا الترسيخ للشخصية الوراثية هو بداية نشوء الحياة واستقلاليتها.
- 4 - لا تعد البويضة المخصبة (الجنين ذو الخلية الواحدة) شخصاً متفرداً أو جديداً فهو لا يملك على ضوء الأسس العامة أيّاً من الخصائص التي تربطه بالبشر، كذلك فهو لا يعد بناء على الأسس العامة العلمية فرداً بسبب إمكانية انقسامه لتكوين فردين (توأم).

وتوجد في الوقت الحاضر إمكانية ربط جنينين صغيرين معاً ببعضهما لتكوين حيوان واحد كامل.

5 - استطاع العلماء خلال الأطوار المبكرة للنمو الجنيني في الحيوانات من اقتطاع خلايا من الجنين من دون التأثير على النمو الطبيعي للجنين، وبذلك لا يمكن اعتبار خلايا الجنين المبكرة أجزاء متخصصة من كائن حي كامل. كما إن الخلايا المكونة للجنين لا تتميز عن تلك المكونة للمشيمة إلا بعد عدة أيام من الإخصاب.

إن حياة الإنسان على المستوى الخلوي والوراثي تتواجد قبل دخول وبعد الإخصاب بصورة مستمرة ودائمة ولكن لا يمكن وضع حدود واضحة المعالم لبدائها فالفرد المتعدد الخلايا لا يظهر إلا بعد أسبوعين على الأقل من الإخصاب وعندها يكون غير متميز الأجزاء. أما الخصائص المحددة للإنسانية كمظاهر الوجه والتصرفات والوعي العقلي فلا تبدأ بالظهور إلا بعد ثمانية أسابيع من الإخصاب وقد تم افتراض خصائص الوعي الذاتي والحياة العقلية بهذه المدة، أي 8 أسابيع لأن اكتمال نضوج الجهاز العصبي للجنين يحدث بعد هذه المدة.

وفي عام 1979 نشر مقال في مجلة هاربرز بقلم هوراس جودسن (Horase Judson) يهاجم فيه علماء الأجنة (بيفس وإدواردز) متهماً إياهم بالبحث عن الشهرة. إن استخدام التلقيح الاصطناعي في تلقيح البويضة بحيامن تعود إلى رجل آخر غير الزوج تؤدي إلى اختلاط الأنساب وبالتالي إلى ضياع الحقوق مع ماثيره هذه الأمور من اعتراضات ومشاكل أخلاقية. لذلك فهي محرمة قطعاً بالنسبة للدين الإسلامي الحنيف، ولكن استخدام السائل المنوي للزوج في تلقيح بويضة تؤخذ من مبيض زوجته أصبحت من الأمور الاعتيادية التي لا غبار عليها.

هذا وقد أثار حكم قضائي أطلقه قاض بولاية كاليفورنيا الجدل مجدداً حول التلقيح الاصطناعي في الولايات المتحدة، عندما اعتبر طفلة الأنابيب «فتاة دون أهل شرعيين» وقال محامي الدفاع أنه ليس هناك سابقة قانونية لوضع هذه الطفلة التي تدعى «جايبي بوزانكا» وبدأت هذه القضية عام 1994 عندما قرر رجل وامرأة كلاهما يعاني من العقم استخدام سائل وبويضة رجل وسيدة مجهولين وقبل ولادة طفلة الأنابيب جايبي بشهر واحد طلب الزوج «جون بوزانكا» الطلاق ورفض تحمل مسؤولية الطفلة. ورغم أن المنطق يرفض على الشخص الذي يتسبب بولادة طفل ما من يتحمل مسؤولية هذا

الطفل، وأصدر القاضي حكماً بعدم أهلية السيدة «بوزانكا» لتكون الأم الشرعية للطفل، وتعد هذه القضية الأولى من قضايا أطفال الأنابيب التي لا تكون فيها للجنين أي صلة عضوية بالأبوين أو بالسيدة المرضعة التي حملته، وقد أيدت المحكمة الزوج السابق بكونه غير ملزم بدفع أي نفقة.

هذا وقد أعلنت طائفة دينية ذات معتقدات غريبة تعرف بـ «الطائفة الرائييلية» (Raelian Movement) ومقرها في جنيف/ سويسرا أنها تنوي القيام بأول عملية استنسال بشري وذلك لأن استنسال الحمل «دولي» كما يقولون كان تأكيداً لعقيدتهم القائلة بأن الحياة على الأرض هي من صنع أخصائيين في علم الوراثة جاءوا من عالم آخر، وتقرح الطائفة منذ بضعة أسابيع «على نشر خبر استنسال دولي» عبر مواقعها في شبكة انترنت على الأهالي إنجاب طفل يحمل المزايا الوراثية ذاتها التي يحملها الأب والأم مقابل مئتي ألف دولار.

وأعلنت هذه الجماعة عن تأسيس شركة سميت بشركة المغامرة الشجاعة (Valiant Ventures) في جزر البهاماس في البحر الكاريبي: إن الاستنسال البشري سيكون حيثما تسود القبلية والعنصرية والتمييز العرقي، حيث إن التطابق الوراثي أكثر خطورة لأنه يفوق القبلية أو الانتماء أو التعصب الفثوي، كما أن أفراد النسخ المتطابقة ستكون من جنس واحد ذكور أو إناث، وهذا قد يعود بالفناء أو القضاء على النظام الاجتماعي لأنه سينتج من عزلة متطرفة تقود للانعزال وعدم الاختلاط بالجنس الآخر.

ومن الجوانب الاجتماعية المهمة الأخرى للاستنسال البشري هو ما ينشأ عن التوالد الذاتي من اضطراب العلاقات الأسرية والاجتماعية الناتجة من هذه الكائنات المكررة: بنوة أم أبوة أم أخوة.

وسبق للعالم د. روبرت سينشيمر (Robert Sinshiemer) أن أشار في العام 1968 إلى إمكانية نسخ الإنسان خلال 10 سنوات ومنذ ذلك الوقت أشار البعض من المهتمين بعلم الباراسايكولوجي «المواهب والقدرات فوق الحسية» إلى أن النسخ المتطابقة يمكنها أن تتصل ببعضها عن طريق التخاطر (نظراً لتطابق الترسيم العصبي «ذبذبات موجات الدماغ» لبعض التوائم) وعليه يمكن استنساخ نسخ لرواد الفضاء والمستكشفين تحت الماء على أعماق سحيقة والجواسيس الذين يعملون في أعماق أراضي العدو والذين يحتاجون إلى اتصالات استثنائية أثناء المهمات الخطيرة باستخدام التخاطر.

يؤدي الاستئصال البشري إلى معاناة القرين أو التطبيق من أزمة الهوية لأنه سيجد صعوبة في تمييز ذاته عن نسخته الأصلية وفقدانه لطابعه الوراثي المميز وفرديته Individuality واستقلاليتته Autonomy وموضوعيته (Objectification) وصلة قرابته (Kinship) ويشكل مظهر الإنسان إحدى آيات تفردته عن سواء وهي التي تولد الإحساس الفريد والمميز بالذات الإنسانية، ويسهم أشد الإسهام في ترسيخ الشعور بقيمة الفرد. والسؤال الذي قد يرد إلى الذهن هو هل يمكن اعتبار الاستئصال البشري نوعاً من عدم الفناء الطبيعي؟ وإذا كان كل من الشخص الأصيل (واهب النواة) والنسخة عنه (القرين أو التطبيق) سيواجه موتاً جسدياً محتوماً فإن النسخة لن تكون سوى تركيباً وراثياً متماثلاً في جسد جديد، وحتى هذا التماثل الوراثي سيكون عرضة للتغيير نتيجة الطفرات التلقائية، فالخلود الحقيقي هو خلود الدنا (DNA) المتسلسل للفرد وذلك باستبدال النسخ المهترئة منه بنسخ جديدة وإلى الأبد.

إن السؤال الأكثر أهمية يتمثل في من الذي سيوافق عن الجنين (القرين) ذاته وليس (بالنيابة) على إجراء عملية النسخ. إن العلاقة بين القرين «النسخة» وأصلها أو بينها وبين متبنيها لن تكون إلا علاقة يشوبها التنافر والغربة وحتى بافتراض تطابق الظروف والعوامل البيئية والاجتماعية لكل من النسخة والأصل فإن القرين لن يقدم أي إضافة بما سبق وأن قدمه «الأصل» والعلاقة بين «القرين» و «الأصل» لن تحددها الظروف البيئية والاجتماعية والنفسية التي سينشأ عليها الطفل المستنسل حسب بل تتحدد أيضاً بالموصفات الشكلية والجمالية والسلوكية. إن مجموعة معقدة من المشاعر والعوامل الكامنة قد تولد الرغبة عند شخص ما لإنتاج نسخة عن ذاته كالرغبة الجامحة في تأمين استمرارية الحياة والأفكار الهذيانة والميول الهستيرية والرغبة في تأكيد الذات والتفاخر والتمايز الاجتماعي والرجسية «حب الذات» وأخيراً استخدام «القرين» كمصدر لقطع الغيار البشرية كبنك للدم والأنسجة والخلايا، وقد تكون الرغبة في الاستئصال هو محاولة الشخص في إيجاد نسخ له بأكثر من قناع اجتماعي كمحاولة للتنفيس عن رغباته المكبوتة فقد يكون فاجراً في أعماقه وقديساً في حياته العائلية والاجتماعية.

وكما أن للاستئصال البشري معارضيته، فإن هناك مؤيدين له، وقد وضع هؤلاء قائمة طويلة من التطبيقات المحتملة التي قد ينجذب إليها الكثيرون في المستقبل القريب والتي تشمل:

- 1 - إمكانية الحصول على مجتمع كبيرة من البشر المتطابقين وراثياً والمنتجين على أساس وراثي محدد ومميز لتشكيل شعب أو أمة مختارة على أسس انتقائية أو لتشكيل جيوش من العسكريين المحترفين، وكذلك لغرض إجراء الدراسات العلمية.
- 2 - استنساخ المواهب والعظماء ومن يتمتعون بقدرات استثنائية بهدف تحسين النوع والحياة.
- 3 - التحكم بجنس الأطفال أو نسب الذكور والإناث في المجتمع.
- 4 - إنجاب أطفال حسب الطلب ممن يمتلكون طابعاً وراثياً مميزاً (نسخ من الزوج أو الزوجة أو أحد الأقارب المتوفين).
- 5 - إلغاء مشكلة العقم بإيجاد حل بديل للحصول على طفل للزوجين العقيمين.
- 6 - إنتاج نسخة جينية من كل فرد، تجمد وتحفظ لوقت الحاجة كمصدر لتزويده بالأعضاء بدلاً من الأعضاء التالفة.
- 7 - نسخ الأصحاء لتلافي مخاطر الأمراض الوراثية الكامنة في «يانصيب» التراكيب الجينية.

إن الإنسان هو الوحيد من بين الكائنات الحية الأخرى له القدرة على قهر الطبيعة. ففي الثلاثة مليارات سنة الماضية، عاش على وجه الأرض أكثر من مئة مليون نوع من الكائنات الحية والتي انقرضت فيما بعد ولم يبق منها سوى مليوني نوع والعديد من هذه الأنواع في طورها للانقراض، والمسألة مسألة وقت ليس إلا، والإنسان هو النوع الوحيد - من بين المليون نوع - الذي يتمتع بالقدرة على البقاء وعلي القيام بعملية تحسين النوع البشري بنفسه. فهل يمكن اعتبار الاستنساخ البشري هو الوسيلة الموعودة والأمل الذي راود الإنسان لتحسين النوع البشري.

إن التكنولوجيا بحد ذاتها تحتل موقعاً حيادياً بين الخير والشر، والأشرار من الناس هم الذين يستعملونها لأغراضهم الشريرة، بينما يمكن أن يستخدمها الأخيار لأغراض الخير. ويبقى السؤال هل يتم استنساخ الآلاف من الطاغية (بول بوت) المسؤول عن مقتل أكثر من مليوني شخص في كمبوديا، أو استنساخ (الأم تيريزا) التي سميت بنصيرة الفقراء أو استنساخ الجمال والموهبة كاستنساخ المثلة جيليان أندرسون (الشكل 8 - 2).

جلیان اندرسون بطلة مسلسل
(ملفات اكس) →



← القاتل المبتسم بول بوت

الأم تيريزا



الشكل (8 - 2): «بول بوت» أم «الأم تيريزا» أم الجميلة جليان أندرسون خيارات
الاستئصال البشري

8 - 2 الاستئصال البشري والدين:

يعد الاستئصال البشري والاستئصال البايولوجي من النوازل المتجددة والتي لا يوجد لها سوابق أو نظائر يمكن الياس عليها، ولكن يبقى الأصل في الإفتاء الشرعي هو المصلحة والفائدة والمنفعة. وفي الحقيقة فإن تقنية الاستئصال تختلف بشكل بين وواضح تماماً عن بقية التقنيات الأخرى (طفل الأنابيب بالحقن المجهري I.C.S.I والتلقيح الاصطناعي داخل الرحم I.U.I وعمية استكشاف الخصيتين واستخلاص الحيوانات المنوية أو الخلايا المولدة لها مع الحقن المجهري للبويضة Tese + ICSI)، حيث لا يمكن عد هذه التقنيات سوابق يمكن الاعتماد عليها في الإفتاء الشرعي. إن النقطة الأساسية التي يجب التوقف عندها هو تحديد مفهوم الاستئصال البشري هل هو خلق (إيجاد شيء من شيء) أم أبداع (إيجاد شيء من لا شيء) والأبداع هو الذي يختص به الله جل وعلى حسب ما يرى د. محمد محروس المدرس الأعظمي الذي يحكم بجواز الاستئصال البايولوجي نظراً لعدم وجود دليل على الحرمة ولأن الأصل في الأفعال هو الإباحة ويشير د. حسين الشافعي أستاذ الفلسفة الإسلامية في جامعة القاهرة إلى أن الاستئصال البشري حتى لو تم تطبيقه فإنه لن يشكل خطراً على عقيدة المسلم في اعتقاده بتفرد الله تعالى بالخلق بمعناه الديني الاعتقادي وذلك لانتفاء صفة الإبداع (خلق شيء من العدم) ولا خلقاً للحياة والنفوس. ﴿يا أيها الناس ضرب مثل فاستمعوا له إن الذين تدعون من دون الله لن يخلقوا ذباباً ولو اجتمعوا له وأن يسلبهم الذباب شيئاً لا يستنقذوه منه ضعف الطالب والمطلوب﴾ (سورة الحج/ الآية 73).

فالاستئصال هو عملية اقتراض خلية (إن صح المعنى) من كائن حي واستخلاص نواتها فيزود بها بويضة أنثى من نفس النوع بعد تفريغها من نواتها الأصلية، ثم يتم إيداعها رحمًا حيًا فيأتي الوليد - بعد إتمام مدة الحمل مشابهاً وتوأمًا للمصدر الذي أخذت منه النواة.

أما بالنسبة للأمهات المرضعات أو النساء اللواتي يؤجرن أرحامهن لتقبل حيامن الأغراب أو البيوض الملقحة من نساء ورجال آخرين أو يتبرعن ببيوضهن فإن الأرحام في

الشرع الإسلامي مصونة محرمة إلا بالنسبة لأزواجهن الشرعيين ولا يجوز الشرع للمرأة أن تتبرع بأجهزتها التناسلية أو تؤجرها أو بعضاً منها لما له من مساس بالكرامة الإنسانية .

وقد يطرح تساؤل آخر : أمن الخير للبشرية أن تنزع إلى تثبيت خصائص معينة وتكرارها بما يفضي إلى التماثل والنمطية . أم الخير لها وجود الفروق الفردية والتنوع الثري في الخصائص الإنسانية والتي هي من حكمة الخالق - سبحانه ﴿ ومن آياته خلق السموات والأرض واختلاف ألسنتكم وألوانكم إن في ذلك لآيات للعالمين ﴾ [سورة الروم 22] .

إن الاستنسال البشري سوف يؤدي إلى تغيير العديد من المفاهيم للعلاقات الأسرية والاجتماعية فما هي العلاقة التي سوف تربط القرين المستنسل بالأصل؟ إن هذا القرين أو الطابق أو التوأم هو شقيق في واقع الحال لمعطي أو واهب الخلية وذلك لأن المادة الوراثية بأكملها لكل من القرين (أو النسخة) وواهب الخلية يقود بالأصل إلى ذات الأم والأب وهي حالة مماثلة لإنجابها توأمين متماثلين ولهم ذات المادة الوراثية ولكن التساؤل هنا سيكون حول مدى أحقية القرين أو النسخة الجديدة في استحقاق الميراث وحرمة التناكح مع المحارم للأصيل ووجوب التكاثر وغيرها من الأمور الشرعية ولنضرب مثلاً هو وجود أب غني وله ولدين فقط هما وريثاه الوحيدين وتمكن أحدهما من دفع التكاليف الباهظة لعملية الاستنسال واستنسل ثلاث نسخ منه ولم يتمكن الآخر أو يرغب من أن يستنسل ذاته لعوامل أخلاقية أو اقتصادية فهل يحصل الابن الثاني الذي استنسل نفسه على أربعة أخماس الميراث «لواهب الخلية حق الوصاية والولاية المعنوية على النسخ الصغيرة العمر من نسخته» ولمن يكون حق الوصاية والولاية على الأطفال القرائن في حالة الموت المبكر لواهب الخلية . وعندما يكبر هؤلاء القرائن هل يطالبون بحق الزواج من ذات زوجة (الأصيل) أي واهب الخلية باعتبار أنهم ذات الشخص سواء توفي أو بقي على قيد الحياة وهناك مشكلة أخرى هي في حالة تبرع امرأة ما بأحد خلاياها لاستنسالها ومن ثم تم زرع الجنين الناتج من عملية الاستنسال في رحمها فهي أي القرينة الأنثى شقيقة أو توأم للأصيلة واهبة الخلية ولكنها أيضاً ابنة لها في ذات الوقت بحكم حملها للقرينة في رحمها وولادتها لها وإرضاعها لها فكيف تجتمع الأخوة والبنوة معاً وهل هناك عشوائية وتجاه نحو التفكك الاجتماعي أكثر مما يتطلب وضع التشريعات الدينية والقانونية التي

تنظم العلاقات بين أفراد المجتمع تجاه هذا التحدي الجديد والذي قد يحاول فيه بعض العلماء من ضعاف النفوس أن يتحدوا قدرة الخالق الباري المصور وهم عاجزون عن ذلك : ﴿أَمْ جَعَلُوا شُرَكَاءَ خَلَقُوا كَخَلْقِهِ فَتَشَابَهُ الْخَلْقُ عَلَيْهِمْ﴾ [الرعد 116] .

إن الخلق لله عز وجل فقط لا غير أما التلاعب الوراثي والتكوين فيستطيعه الإنسان باستخدام ما خلقه الله من وسائل فالإنسان لم يخلق البويضة أو الحيمن أو الكروموسوم وقد استطاع الإنسان أن يخصب البويضة في أنابيب الاختبار وأن يستنسل المادة الوراثية فيغير من بعض صفاتها وأن يكون نسخة اصطناعية من بعض الجينات وحتى الكروموسوم ولكن كل ذلك تم اعتماداً على مواد أساس ووحدات بنائية خلقها الله أو اعتماداً على قالب أو شفرات وراثية من صنع الله فسبحان الله الذي يَخْلُقُ ولا يُخْلَقُ. أما الإنسان الذي يجنح إلى تشويه هذه الصورة الجميلة المنظمة ويعبث بها باستخدام مقصاته الجزيئية ويعيدها إلى عشوائية اللاستقرار والعبثية فإن الله عز وجل يخاطبه في محكم كتابه : ﴿يَا أَيُّهَا الْإِنْسَانُ مَا غَرَكَ بِرَبِّكَ الْكَرِيمِ . الَّذِي خَلَقَكَ فَسَوَّاكَ فَعَدَلَكَ . فِي أَيِّ صُورَةٍ مَا شَاءَ رَكَّبَكَ﴾ [سورة الانفطار : الآيات 6 - 8] .

المصادر العربية

- إسلام ، أحمد . (1988) . لغة الكيمياء عند الكائنات الحية . سلسلة عالم المعرفة . المجلس الوطني للثقافة والفنون والآداب .
- الأشقر ، محمد سلمان عبد الله . (1997) . الاستنساخ في ميزان الشريعة الإسلامية . الدورة العاشرة لمجمع الفقه الإسلامي في جلة .
- الجابري ، أحمد عمرو . (1998) . تعيين جنس الجنين والممارسات الأخلاقية والطبية والاجتماعية . دار البشير للنشر والتوزيع .
- الجلبي ، قصي عبد القادر . (1991) . الأحماض النووية . جامعة الموصل . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . مطبعة جامعة الموصل .
- الربيعي ، محمد . (1986) . الوراثة والإنسان (أساسيات الوراثة البشرية والطبية) . سلسلة عالم المعرفة (100) . المجلس الوطني للثقافة والفنون والآداب .
- الزعاك ، علي عبد الرحمن . (1989) . استنساخ البشر : اعتبارات أخلاقية وحيوية في الهندسة الوراثية . مجلة آفاق عربية (السنة الرابعة عشر) صفحة : 140 - 143 .
- الزعاك ، علي عبد الرحمن . (1997) . عصر الاستنساخ . مجلة علوم العدد : 92 . صفحة 22 .
- السعيد ، عبد الله عبد الرزاق . (1997) . القنبلة الجينية (الوراثية) واستنساخ النعجتين بوللي ودوللي والثور الأمريكي . مجلة الدواء العربي . العدد 2 السنة 16 . صفحة 151 .
- الشافعي ، حسن . (1997) . الاستنساخ البشري من وجهة نظر شرعية . مجلة العربي العدد : 664 صفحة 631 - 141 .
- العبيدي ، أياد محمد علي . (1999) . معالجة الأمراض وبعث الحيوية في الخلايا باستعمل الإنزيمات - إنزيم التيلوميراز . مجلة علوم . العدد (105 و 106) صفحة 68-69 .
- العبيدي ، أياد محمد علي . (1999) . الهندسة الوراثية والصدمة الحضارية : الآفاق

- والمخاطر من المعالجة الوراثية إلى القنبلة الجينية . مجلة علوم العدد (102) آذار - نيسان (1999) صفحة : 43 - 44 .
- العبيدي ، أياد محمد علي (2000) . الاستنساخ البشري وهندسة الإنسان وراثياً الأوهام والحقائق . مجلة علوم . العدد (107) صفحة 36 .
- العبيدي ، أياد محمد علي . (1999) . هندسة التحوير الجيني وإنتاج الفئران عبر الوراثة العملاقة . ورشة العمل عن الاتجاهات الحديثة لاستخدام النظائر المشعة والإشعاع في التكنولوجيا الحيوية القاهرة 27 - 30 نوفمبر 1999 .
- العبيدي أياد محمد علي . (2000) . هندسة التحوير الجيني والاستنساخ البيولوجي . مجلة علوم . العدد (108) - آذار - نيسان صفحة 42 - 43 .
- العذاري - عدنان حسن محمد (1986) . أساسيات في الوراثة . جامعة الموصل وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .
- الكريم ، صالح عبد العزيز . (1997) . الاستنساخ : تقنية فوائد ومخاطر ، كلية العلوم . جامعة الملك عبد العزيز .
- الكويتي ، عبد الله صادق . (1985) . الهندسة الوراثية . الجزء الثاني ، الموسوعة الصغيرة . العدد 158 . دار الحرية للطباعة .
- العلمي ، رياض رمضان . (1988) . الدواء من فجر التاريخ إلى اليوم . سلسلة كتب عالم المعرفة . المجلس الوطني للثقافة والفنون والآداب .
- الموصلي ، سامي أحمد (2000) الاستنساخ البشري بين خيال العلماء وواقع الأطباء . مجلة الفتح . السنة الأولى عدد خاص صفحة 32 - 37 .
- النعيمي ، فادية . الاستنساخ : تفوق بيولوجي جديد يثير تساؤلات خطيرة . (مقالة مترجمة) . مجلة ألف باء . العدد (1489) . 9 / نيسان / 1997 .
- برونوطي ، رمزي . (1997) الاستنساخ هل يكون الحل لبعض أسباب العقم ؟ مجلة الطبيب العراقية - العدد الأول - تموز 1997 .

- جاردنر، أ، ج ود - ب سنستاد. (1984). مبادئ علم الوراثة. (مترجم). الدار العربية للنشر والتوزيع.
- جلبي، خالص. (1997) هل يستنسخ البشر. مجلة العربي. العدد (364). صفحة 71 - 75.
- حلمي، مصطفى محمود. (1997). آخر قنابل هندسة التكاثر. مجلة العربي العدد 364. صفحة 65 - 70.
- حماش، محمود حياوي. (1997). أهمية التطورات الحديثة في الاستنساخ الوراثي. مجلة الطبيب العراقية - العدد الأول - تموز 1997.
- خلف، ازور نعمان. (1986). التقنية الحيوية والهندسة الوراثية - موسوعة علوم سلسلة كتاب الثقافة العلمية. العدد 70 وزارة الثقافة والإعلام.
- دور روبرتس، اي. م وأوليفر، ج ورايت، اي، ف. (1992). جينات الخانة المثلية وخطة التكون الجسدي لدى الفقريات. مجلة العلوم. المجلد 8. العدد 9.
- رستنك، د. ل. (1995). اتجاهات في البيولوجيا: لماذا نشيخ. مجلة العلوم. المجلد 11. العددان 8 و 9.
- رورفيك، د. م. في مرآته: استنساخ الإنسان. ترجمة بعنوان "تناسخ الأجساد"، (1978) ديكران هيجنيان. دار الحكمة للطباعة والنشر.
- زاوية علوم وتكنولوجيا. (1999). وبدأ عهد زراعة الراس في الإنسان / جريدة الرأي الأردنية العدد 10586 - 3 أيلول.
- سعيد، منى. (2000) تقنية الجينات. قابلية التعلم حتى الموت. مجلة ألف باء - صفحة 31.
- سعيد، منى. (1997). بحوث الجينات (أهم اكتشاف علمي لهذا القرن) مقالة علمية مترجمة. مجلة ألف باء العدد 1488.
- سلطان، سندس هادي. (1987). استخلاص الماتة الوراثية (الحامض النووي) لمومياء صفحة الإنسان والمعرفة. جريدة الثورة الصادرة يوم 8 / 7 / 1987.

- سليمان ، سعد هادي . (1986) . علم الوراثة سلاح لإعادة الشباب . مجلة العلم والمستقبل . العدد 1 . وزارة الثقافة والإعلام . دائرة الإعلام الداخلي .
- صالح عبد المحسن . (1979) . ما يفرقه الإنسان تجمعه الحياة . مجلة العربي العدد 782 . صفحة 114 - 120 .
- عامر ، مدحت . (1997) . الإخصاب وشبح الاستنساخ البشري . مجلة طبيبك الخاص . العدد 543 . دار الهلال .
- عبد الله ، وسيم . (1985) . أنظمة التحكم بوساطة الحيوانات . مجلة العربي . العدد (613) مارس آذار 1985 .
- عبود ، خزعل . (1988) . لماذا التلقيح الاصطناعي في الأبقار . مقالة في جريدة الثورة الصادرة يوم 8 / 10 / 1988 .
- عطا الله ، عبد الفتاح محمد . (1997) . الاستنساخ مرة أخرى . مجلة العربي . العدد (764) . صفحة : 116 - 119 .
- علوان ، سامي فاضل . (1993) . نقل الأجنة في الحيوانات المزرعية . نشرة التقنيات الحياتية (أخبار ومعلومات) . وحدة التقنيات الحياتية كلية التربية / جامعة الموصل . العدد (4) نيسان 1993 .
- عماش ، هدى صالح مهدي ، العبيدي ، عبد الحميد ؛ المدرس ، محمد محروس ؛ محمود ، ضاري خليل ؛ الفخري ، عوني . (1999) . الاستنساخ البشري ... الطب والعلوم ... الشريعة والقانون . بيت الحكمة ، ساسلة المائدة الحرة رقم 44 .
- عماش ، هدى صالح مهدي . (1988) . الهندسة الوراثية تقنية جديدة أم خطر كوني . موسوعة علوم . سلسلة كتاب الثقافة العلمية العدد 20 .
- فتحي ، حسن . (1997) . الاستنساخ بين طموح العلم ومخاوف البشر / ملف العدد مجلة علوم وتكنولوجيا العدد (41) . صفحة 19 - 29 .
- فلاندر ، هـ . و ، لوبون ، هـ ودورهان ، ن . و . (1997) . حيوانات محورة جينياً كمصانع للأدوية . مجلة العلوم . المجلد 13 العدد (4) . صفحة 34 - 39 .

- قره داغي ، ك . (1978) . الإنسان : آخر المعلومات العلمية عنه . الموسوعة الصغيرة (20) . منشورات وزارة الثقافة والإعلام والفنون .
- كيفلس ، دانييل . (1993) . التاريخ العاصف لعلم وراثه الإنسان / ترجمة الدكتور أحمد مستجير ، المكتبة الأكاديمية .
- محمد ، محمود الحاج قاسم . (1999) . الاستئسال (الاستئساخ) بين العلم والدين . مكتبة الجيل العربي ، الموصل .
- معارج ، محمد عبد المحسن . (1999) . مقدمة في الهندسة الوراثية . جامعة دمشق .
- هيوار ، ايفلين . (1977) . علم الأنسجة لطلبة الطب البشري . ترجمة د . عبد الفتاح محمد طيرة . مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر .
- ويلسون ، ج . ب و موريسون ، ج . ج . (1978) . علم الخلية . ترجمة د . جبرائيل برصوم عزيز ، السيد طلال فتحي العزاوي ، السيد يحيى ذنون اليونس . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة الموصل .
- ويلسون ، أ . (1999) . الاستئساخ لأغراض طبية . مجلة علوم المجلد (15) - العدد (5) - مايو - أيار 1999 - صفحة 34 - 39 .
- يوسف ، فيصل . (1997) . الكشف عن تجارب لحفز خلايا بشرية على النمو في المختبرات (مقالة في ملحق الواحة الأسبوعي) جريدة الاتحاد الإماراتية الصادرة يوم الخميس 7 أغسطس (آب) 1997 .

REFERENCES

- A -

- 1 - Aitken, R.J and Irvine, D. S. (1996). Fertilization without Sperm. *Nature*. 379 : 493 - 495.
- 2 - Annas, G. J. (1998). Why we should ban Human Cloning. *N. Engl. J. Med* 339 : 122 - 125.
- 3 - Awguleqitsch, A. and Jacobs, D. (1992). Deformed autoregulatory element from *Drosophila* functions in a conserved manner in transgenic mice - *Nature*. 358 : 341 - 346.

- B -

- 4 - Barinaga, M.; Yamonoto, G.; Rivier, C.; Vale, W.; Evans, R. and Rosenfeld, M, G. (1983). Transcriptional regulation of growth hormone gene expression by growth hormone - releasing factor. *Nature*. 306 : 84 - 85.
- 5 - Begley, S. (1997). Can we clone humans? *Newsweek*, March 10, pp. 53 - 60.
- 6 - Bensaude, O.; Babient, C.; Morange, M - and Jacob, F. (1983). Heat shock proteins. First major products of zygotic gene activity in mouse embryo *Nature*. 305 : 331 - 332.
- 7 - Borrebaeck, C. A and Hagan, I. (1992) Electromanipulation in Hybridoma technology : A laboratory manual. Stockton press.
- 8 - Bray, D. (1979). Cytochalasin action. *Nature*. 282 : 673.
- 9 - Brinster, R. L.; Chen, H. Y. and Trumbauer, M. E. (1981). Mouse Oocytes transcribe injected Xenopus 5S RNA gene. *Science*. 211 : 396 - 398.
- 10 - Brinster, R. L.; Chen, H. Y.; Trumbauer, M. E.; Yagle, M. K. and Palmiter, R. D. (1985). Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *proc. Natl. Acad. Sci, USA*. 82 : 4438 - 4442.
- 11 - Brinster, R. L., Ritchie, K. A.; Hammer, R. E.; O'Brien, R. L.; Arp, B. and Storb, V. (1983). Expression of a microinjected immunoglobulin gene in the Spleen of transgenic mice. *Nature*. 306 : 332 - 336.

- 12 - Buhler, T. A.; Bruye're, Th.; Went, D. F.; Stranzinger, G. and Burki, k. (1990). Rabbit β - Casein Promoter directs Secretion of human interleukin - 2 in to the milk of Transgenic rabbits. *Biotechnol.* 8 : 140 - 143.
- 13 - Butler, D. (1997). Roslin patents Come under the spotlight. *Nature.* 387 : 217.

- C -

- 14 - Campbell, K. H. S.; McWhir, J.; Ritchie, W. A. and Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a Cultured Cell line. *Nature.* 380 : 64 - 66.
- 15 - Campbell, K. H. S.; Mc Whir, J., Ritchie, W. A and Wilmute, I. (1996). Implication of cloning. *Nature.* 380 : 383.
- 16 - Capecchi, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science.* 244 : 1288 - 1292.
- 17 - Chang, M. C. (1959). Fertilization of Rabbit Ova in vitro. *Nature.* 184: 466 - 467.
- 18 - Cosmic, M. and Inam, S. (1997). Implications of Dolly the clone. *Saudi Medical. Journal.* 18 : 543 - 454.
- 19 - Costantini, F and Lacy, E. (1981). Introduction of a rabbit β - globin gene in to the mouse germ line. *Nature.* 294 : 92 - 94.
- 20 - Coupland, D. (1997) - Will there ever be anather you. (Aspecial report on cloning). *Time*, March 10, 1997.

- D -

- 21 - De Mayo, F. J.; Mizoguchi, H.; Dukelow, W. R. (1980). Fertilization of Squirrel monkey and Hamster Ova in the Rabbit Oviduct. (Xenogenous Ferrilization). *Science.* 208 : 1468 - 1469.
- 22 - Driever, W. and Fishman, M. C. (1996). The Zebrafish : Heritable Disorders in Transparent embryos. *J. clin. Invest.* 97 : 1788 - 1794.

- E -

- 23 - EITORIAL. (1996). What to do with Spare embryos. *The Lancet.* Vol. 347, No 9007, April 1996.
- 24- EDITORIAL. (Short - circuit to be avoided by bioethics committees. *Nature.* 387: 321.

25- Edwards, R.G. (1971). Problems of Artificial fertilization. *Nature*. 233: 23 - 25.

26- Evans, M.J. and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of Pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292: 154 - 156.

- F -

27- Frankham, R. and Gilling, M.R. (1984). Molecular biology and its application to domestic animals. In:

Animal genetic resource cryogenic Storage of germplasm and Molecular engineering, FAO 44/2 Rome.

- G -

28- Gilbert, S.F. (1991). Developmental biology, Third Edition, Sinauer publication.

29- Glover, D.M. (1984). Gene cloning: The mechanics of DNA Manipulation. Chapman and Hall.

30 - Godke, R.A. and Rorie, R.W. (1993). Embryo microsurgery for. Large animals. pp. 155 - 163. In: Gamete and embryo micromanipulation in human reproduction., Edited by: Fishel, S. and. Symonds, M. Edward Arnold publication.

31 - Goodell, R. (1980). When they were New: Rocketry, Fission and cloning., Scisquest. 53 : 29.

32 - Gurdon, J.B.; Lane, C.D. Woodland, H.R. and Marbaix, G. (1971). Use of frog eggs and Oocytes for the Study of Messenger RNA and translation in Living cells. *Nature*, 233 : 177 - 182.

-H -

33 - Hammer, R.E.; Pursel, V.G.; Rexroad, C.E.; Walit, R.; Bolt D.J.; Ebert, K.M.; Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. (1985). Production of transgenic rabbits. *Nature*. 315 : 63 - 66.

34 - Harbers, K.; Jahner, D. and Jaenisch, R. (1981). Microinjection of cloned retroviral genomes into mouse zygotes : Integration and expression in the animal. *Nature*. 293 : 540 - 542.

- 35 - Harris, A.M.; Whittingham, D.G. and Wilson, L. (1982). cytoplasmic control of Preimplantation development in Vitro in the mouse. *Nature*. 299 : 460 - 462.
- 36 - Hogan, B. (1983). Enhancers, Chromosome Position. effects, and transgenic mice. *Nathre*. 294 : 9 -10.
- 37 - Holden, C. (1997). Calf cloned form bovine cell Line. *Science*. 277 : 903.
- 38 - Hsu, Y.C. and Gonda, M.A. (1980). Monozygotic Twin formation in mouse embryos in Vitro. *Science*. 209 : 605 - 606.
- 39 - Hunlich, T.A; Trotnow, S. and Kniewald, T.(1984). In Vitro Fertilization and Embryotransfer implications for genetic engineering. In: Genetic Manipulation: Impact on man and Society; Arber, W, etal. (Edit). PP.239 - 245. The ICSU Press.

- J -

- 40 - Jaenisch, R. (1988). Transgenic animals. *Science*. 240 : 1468 - 1474.

- K -

- 41 - Kahn, A.(1997). clone mammals.... clone man? *Nature*. 386 : 119.
- 42 - Kassirer, J. P and Rosenhal, N.A. (1998). Should human cloning research be off limits. *N Engl J Med*. 338 (13). 905 - 906.
- 43 - Kobayashi, Y.; Santulli, R.; wright, K.H. and Wallach, E.E.(1981). *Science* 213 : 1127 - 1128.
- 44 - Kolata, G. (1983). In Vitro Fertilization Goes Commercial. *Science*. 221: 1160 - 1162.
- 45 - Kubiak, J.Z. and Tarkowski, A.K. (1985). Electro Fusion of mouse blastomeres. *Exp, cell. Res*. 157 : 561 - 566.

- L -

- 46 - Leder, P.; Hansen, J.N; Konkel, D.; Leder, A.; Nishioka, Y. and Talkington, C. (1980). Mouse globin System: A. Functional and evolutionary analysis. *Science*. 209 : 1336 - 1337.
- 47 - Lewis, J.; Yang, B.; Detloff, P. and Smithies, O. (1996). *J. clin. Invest*. 97 : 3 - 5.

48 - Lin, T.P.; Florence, J. and OH, J.O. (1973).

cell fusion induced by a virus within the Zona pellucida of Mouse eggs. *Nature*. 242 : 47 - 49.

- M -

49 - MacIlwain, C. (1993). Cloning of human embryos draws fire from Critics. *Nature*. 365 : 778.

50 - Majzoub, J.A. and Maglia, L. (1996). Molecular medicine : Knockout Mice. *N. Engl.J. Med.* 334 : 904 - 907.

51 - Marx, J.L. (1981). Three Mice "cloned" in Switzerland. *Science*. 211 : 375 - 376.

52 - Marx, J.L. (1981). More Progress on Gene transfer *Science*. 213 : 996 - 997.

53 - Marshall, E. (1997). Varmus grilled over breach of embryo research ban. *science*. 276 : 1963.

54 - Marshall, E. (1997). The mouse that Prompted a roar. *Science*. 277 : 24 - 25.

55 - Marth, J.D. (1996). Recent advances in gene mutagenesis by site - directed Recombination. *J. Clin. Invest.* 97 : 1999 - 2001.

56 - McGrath, J. and Solter, D. (1983). Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion *Science*. 220 : 1300 - 1302.

57 - McGrath, J. and Solter, D. (1983). Nuclear transplantation in mouse embryos. *J. Exp. Zool.* 228 : 355 - 362.

58 - McGrath, J. and Solter, D. (1984). Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science*. 226 : 1317 - 1319.

59 - Modlinski, J.A. (1978). Transfer of embryonic nuclei to fertilised mouse eggs and development of tetraploid blastocysts. *Nature*. 273 : 466 - 467.

60 - Modlinski, J.A. (1981). The fate of inner cell mass and trophectoderm nuclei transplanted to fertilized mouse eggs. *Nature*. 292 : 342 - 343.

- 61 - Mullins,J,J and Mullins, L.J. (1993). Transgenesis in Nonmurin Species. *Hypertension*. 22(4). 630 - 633.
- 62 - Mullins,L,J and Mullins, J.J. (1996). Transgenesis in the Rat and Larger.J.Clin Invest. 97: 1557 - 1560.

- N -

- 63 - Nagel, R.L. (1998). A Knockout of a transgenic mouse - Animal models of Sickle cell anemia. *N. Engl. J. Med.* 339: 194 - 195.
- 64 - Nagy, A; Gocza, E.; Diaz, E. M.; Prideaux, V.R.; Ivanyi. E.; Markkula,M and Rossant, J. (1990). Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development*. 110 : 815 - 821.
- 65 - Nagy, A and Rossant, J. (1996). Perspectives series: Molecular Medicine in genetically engineered Animals - Analysis of phenotype without Germ line transmission, *J. clin. Invest.* 97 : 1360 - 1365.
- 66 - Nagy, A.; Rossant, J; Nagy, R.; Newerly, W.A. and Roder,J.C. (1993). Derivation of completely cell culture - derived mice. from early - Passage embryonic Stem cells *proc. Nati. Acad. Sci. USA*. 90: 8424 - 8428.
- 67 - Norman, C. (1983). Clerics Urge Ban on Altering Germline cells. *Science*. 220 : 1360 - 1361.

- O -

- 68 - Orban, P.C; Chui, D. and Marth, J. D. (1992). Tissue - and Site - Specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc. Nati. Acad. sci, USA PP.* 6861 - 6865.

- P -

- 69 - Palmiter, R.D. and Brinster, R.I. (1984). Making a bigger mouse, In: Genetic manipulation impact on man and Society, Arber, wW. *et al.* ICSU Press.
- 70 - Palmiter, R.D; Brinster, R.L; Hammer, R.E; Trumbaur, M.E; Rosenfeld, M.G; Brinberg, M.C, and Evans, R.M. (1982). Dramatic growth of Mice that develop from eggs microinjected with metallothionein growth hormone fusion genes. *Nature*. 300: 611 - 615.

- 71 - Petri, W. (1982). Transgenic Organisms and development, Nature 299: 399 - 400.
- 72 - Pursel, V.G.; Pinkert, C.A.; Miller, K.F.; Bolt, D.J.; Campbell, R.G.; Palmiter, R.D.; Brinster, R.L. and Hammer, R. E. (1989). Genetic Engineering of Livestock. Science. 244 : 1281 - 1288.

- R -

- 73 - Raven, J and Johnson, B. (1992). Biology, 3Ed Int. Mosby Year book.
- 74 - Rich, V. (1978). Study begins on baby mammoth - Nature. 273 : 483.
- 75 - Robertson, J.A. (1996). Genetic selection of offspring characteristics. Boston univ Law. Rev. 76 : 421 - 482.
- 76 - Robertson, J.A. (1998). Liberty, Identity and Human cloning. Texas Law Review Association 76. 1371 - 1456.
- 77 - Robertson, J.A. (1998). Human Cloning and the Challenge of Regulation. N Engl J Med. 339 (2) 119 - 122.
- 78 - Rossant, J. (1976). Postimplantation development of blastomeres isolated from 4 and 8 - cell mouse eggs. J. Embryol. exp. Morph. 36: 283 - 290.
- 79 - Rowson, L.E.A. (1971). Egg transfer in domestic animals. Nature. 233: 379 - 381.
- 80 - Ruddle, F.H. (1981). A new era in mammalian gene mapping: somatic cell genetics and recombinant DNA Methodologies Nature. 294: 115 - 119.

- S -

- 81 - Schellekens, H. (1993). DNA Makers: Architects of life. Nature and Techniek Publication.
- 82 - Schnieke, A.S.; Kind, A.J.; Ritchie, W.A.; Mycock, K.; Scott, A.R.; Ritchie, M.; Wilmut, I.; Colman, A. and Campbell, K.H.S. (1997). Human Factor IX Transgenic Sheep produced by transfer of nuclei from transfected Fetal Fibroblasts. Science. 278 : 2130 - 2133.
- 83 - Seidel, G.E. (1981). Superovulation and Embryo transfer in Cattle. Science. 211 : 351 - 357.

- 84 - Seno, T. and Sato, S. (1959). A chimaeric Duck with the head of a chick. *Nature*. 184 : B.A. 78 - 79.
- 85 - Shapiro, H.T. (1997). Ethical and policy Issues of Human cloning. *Science*. 277: 195 - 196.
- 86-Shuldiner, A. R. (1996) Transgenic animals. *N. Engl. J. Med.* 339: 653 - 655.
- 87 - Simons, J.P; Wilmut I; Clark, A.J.; Archibald, A.; Bishop, J.O. and Latho; R. Gene transfer into Sheep. *Biotechnol.* 6 : 179 - 183.
- 88 - Slack, J.M.W. (1996). High hops of transgenic frogs. *Nature*. 383 : 765 - 766.
- 89 - Solter, D. (1988). Differential imprinting and Expression of Maternal and paternal genome *Annu. Rev. Genet.* 22: 127 - 146.
- 90 - Solter, D. and Knowles, B.B. (1975). Immunosurgery of mouse blastocyst. *proc. Nat. Acad. Sci USA*. 72: 5099 - 5102.
- 91 - Stranzinger, G.F. (1984). Problems of Genetic engineering in animal breeding *Genetic Manipulation: Impact on man and Society*, Arber, W. et al (edit). PP. 235 - 238. the ICSU Press.

- T -

- 92 - Tarkowski, A.K. (1959). Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature*. 184 : 1286 - 1287.
- 93 - Timson, J. (1993). Preparative techniques in Micromanipulation. chapter 2. PP. 21 - 35. In: *Gamete and embryo Micromanipulation in human reproduction*, Edited by : Fishel, S. and Symonas, M. Edward Arnold publication.
- 94 - Tsien, J.Z. (2000) . Building a brainier mouse *Scientific American* April 2000 PP. 62 - 68.

- W -

- 95 - Weiss, R. (1997). Scottish Scientists clone adult sheep. page A01. the Washington post.
- 96 - Weiss, M.J. and Orkin, S.H. (1996). In Vitro differentiation of murine embryonic stem cells: New approaches to old problems. *J. clin. Invest.* 97 : 591 - 595.

- 97 - Willadsen, S.M.(1981). The developmental capacity of blastomeres from 4 and 8-cell sheep embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 65: 65 - 172.
- 98 - Willadsen, S.M. (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320 : 63 - 65.
- 99 - Williams N. (1997). Will Dolly send in the clones?. *Science*. 275. 7 march 1997 P. 1415.
- 100 - Wilmut, I. (1998). Progress in combining embryo techniques and gene technology. *Acta. Aric. Scand . A. Animal Sci - suppl.* 29: 37- 43.
- 101 - Wood, S.A.; Allen, N.D.; Rossant, J; Auerbach, A. and Nagy, A. (1993). Non - injection methods for the production of embryonic Stem cell - embryo chimaeras. *Nature* 365 : 87 - 89.

- Z -

- 102 - Zeilmaker, G.H. (1973). Fusion of rat and mouse morulae and formation of chimaeric blastocysts. *Nature* 242 : 115 - 116.

قراءات إضافية مقترحة

- 1 - Human Longevity. (1993). Smith, D.W.E. Oxford university Press.
- 2 - Reversing Human Aging. (1996). by: Fossi, M. William and Co publication.
- 3 - The making of a fly: The Genetics of animal design. (1992). Peter A. Lawrence Blackwell Scientific publication.
- 4 - Remaking Eden: Cloning and beyond in a brave new world. (1997). Steven, L.M. Avon Books publication.
- 5 - Clone: The road to Dolly: and the path ahead. (1998). Kolat, G.B. Morrow publication.
- 6 - Genetic engineering of animals. (1986). Evans. J.W. and Hollaender, A. Plenum publication.